Lane Medical Library

Aus der Bayerischen Veterinärpolizeilichen Anstalt in Oberschleißheim.
Vorstand: Direktor Dr. Drescher.

Beiträge zur Züchtung des Bacillus abortus Bang auf festen Nährböden.

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Vorgelegt von

Joseph Witzigmann
approb. Tierarzt
aus Haßloch (Rheinpfalz).

Buchdruckerei Hohenhaus, Osterwarngau am Taubenberg (Obby.)
1932

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät de
Ludwig-Maximilians-Universität München.

Referent: Prof. Dr. Ernst.

Meinem lieben Vater
in Dankbarkeit gewidmet!

A. Literatur.

Die erste Reinzüchtung des Bazillus abortus Bang gelang Bang und Stribolt (zit. 16) in Serumgelatineagar-Schüttelkulturen. Das Wachstum befand sich in einer Zone, die $^1/_2$ cm unter der Oberfläche lag und bis $1^1/_2$ cm stark war. Wurden beimpfte Nährböden in ein etwa 90% Sauerstoff enthaltendes Gefäß gebracht, so zeigten sich 2 Wachstumszonen. Eine dicht unter der Oberfläche und eine in einer Tiefe, die einem niedrigeren Sauerstoffgehalt als dem der der atmosphärischen Luft entsprach. Es waren damit zwei Wege gewiesen.

Der Eine: Züchtung unter einer höheren Sauerstoffspannung. Ihn beschritt Holth (16), indem er einen Apparat konstruierte, in dem die Kulturen unter etwa 90% Sauerstoff gehalten wurden.

Der zweite Weg: Der die Kultur umgebenden Luft wird ein Teil des Sauerstoffes entzogen. Die zweite Möglichkeit versuchte Nowak (zit. 46) auf dem Wege der Symbiose mit einem Aerophilen, in dem er die mit Abortusbazillen beimpften Nährböden zusammen mit Kulturen des Bazillus subtilis in ein luftdicht verschlossenes Gefäß brachte. Dadurch, daß die Kulturen des Bazillus subtilis aus der Luft Sauerstoff absorbierten, sollte eine für das Gedeihen des Abortusbazillus günstige Sauerstoffspannung erzielt werden.

Auf dem gleichen Gedanken beruht die Methode von Smith und Fabyan (zit. 47). Die beiden Forscher verwendeten zur Sauerstoffabsorption Bakterium coli, Bakterium megatherium und Staphylokokken. Ein weiteres Symbiose-Verfahren ist das von Ascoli (1). Er züchtete den Abortusbazillus zusammen mit dem Milzbrandbazillus.

Die Beurteilung der einzelnen symbiotischen Methoden ist sehr verschieden. Zwick und Zeller (50 bezeichnen die Subtilis-Methode als sehr gut und als die geeignetste um aus verunreinigtem Material auf Platten zu züchten. Zwick und Krage (48) stellten fest, daß bei Anwendung des Nowak'schen Verfahrens bedeutend bessere Ergebnisse erzielt wurden als auf Schrägagar mit Paraffinverschluß. Zu dem gleichen Ergebnis kam Witte (44) bei der Züchtung aus dem Magendarmkanal abortierter Feten. Winkler (43) zieht das Ascoli-

Verfahren dem Nowak'schen vor, da bei Milzbrand-Symbiose das Wachstum kräftiger und schneller sei. Zwick (47) sieht einen Vorteil des Bakterium coli darin, daß es keine Sporen bildet. Stafseth (34) konnte keine Vorzüge der Subtilis-Methode gegenüber seinem eigenen Verfahren der Luftverdünnung finden. Nach Zeller (46) ist die Nowak'sche Subtilis-Methode gleichermaßen geeignet wie der einfache Paraffinverschluß. Lerche (23) macht zwischen Subtilis-Pseudomilzbrand- und Colibazillen keinen Unterschied. Er bezeichnet allgemein das Verfahren der Symbiose als das geeignetste. In einer späteren Arbeit (24) konnte er mit Kohlensäure und Leuchtgas keine besseren Ergebnisse erzielen, als durch die Züchtung mit Bakterium coli. Zeh (zit. 47) und nach ihm Goerttler (13) beimpft den fünften Teil der im übrigen mit Bazillus abortus Bang angezüchteten Agar-Platten mit Coli und verschließt sie mit Plastilin. Modifiziert wird dieses Verfahren von Prillwitz (26), der die zum fünften Teil mit Coli beimpften Platten nicht mit Plastilin abdichtet, sondern in einem luftdicht verschlossenen Gefäß unterbringt.

Zwick und Wedemann (49) prüften das Wachstum des Abortusbazillus in verschiedenen Gas-Atmosphären. Unter anaeroben Bedingungen nach dem Lentz'schen Verfahren — Absorption des Sauerstoffes durch Pyrogallol unter Zugabe von Kalilauge (Zentralbl. f. Bakt. Abtg. I, Orig. Bd. 53 S. 358) — zeigte sich nach 45 Tagen noch kein Wachstum. Versuche in Wasserstoff- und Stickstoffatmosphäre zeitigten das gleiche negative Ergebnis. In Kohlensäureatmosphäre wurden 2 Stämme gezüchtet (aerober Stamm und typischer Stamm). Sie zeigten Verlangsamung bezw. Fehlen des Wachstums. Durch Sauerstoff wurde die Kultur nicht beeinflußt.

Nach Hutyra-Marek (19) gelingt die Kultur gut in fast reiner Oxygenatmosphäre. Am geeignetsten zur Züchtung hält Fitch (9) ein Luftgemisch von 10% Kohlendioxyd oder Wasserstoff. Nach Smith (37) bedürfen frischgezüchtete Stämme eines Kohlensäuregehaltes der Luft von 2,5% bis 10%. Ebenso hält Schlossmann (31) einen Kohlensäuregehalt von 10% für das Optimum. Rose (29) gibt der Kohlensäurespannung vor Sauerstoff und dem Beimpfen von dem fünften Teil der Platte mit Coli den Vorzug. Wilson (42) bezeichnet den Sauerstoff für nicht weniger wichtig als die Kohlensäure. Die optimale Konzentration beziffert er mit 20% Sauerstoff und 5 bis 10% Kohlensäure. Der Sauerstoffgehalt soll nicht niedriger sein als der der Luft. Die wachstumfördernde Wirkung der Kohlensäure beruht seiner Ansicht nach nicht darauf, daß sie den H-Jonengehalt des Mediums erhöht, sondern auf ihrer Fähigkeit die Zellwände leichter zu durchdringen als die H-Jonen. Im Inneren der Zelle würde dann eine er-

höhte Acidität hervorgerufen, die dann möglicherweise einen Wachstumsreiz ausübt.

Huddleson (18) hält für das Wichtigste die Kohlensäurespannung. Er erzielte üppiges Wachstum, wenn die beimpften Nährböden in einen Rezipienten gebracht wurden, in dem dann 10% der Luft durch Kohlensäure ersetzt wurden. Kristensen (21) findet die Huddleson-Methode bequemer als die Züchtung bei fast reinem Sauerstoff oder bei 90% atmosphärischem Sauerstoff, oder in hohen Schichten (Zonenwachstum). Die Kohlensäure wird in dem Gefäß, in dem sich die Kulturen befinden, dadurch entwickelt, daß man pro Liter Luftraum des Gefäßes 2 ccm von Normal-Schwefelsäure in eine größere Menge doppeltkohlensaures Natron fließen läßt. Haupt (15) führt genau abgemessen 10% technische Kohlensäure in das luftdicht verschließbare Kulturgefäß ein.

Ehrlich (7) schlägt zur Erzielung einer für das Wachstum günstigen Atmosphäre Leuchtgas vor. Er läßt in das mit der Öffnung nach unten gehaltene, beimpfte Schrägagar-Röhrchen Leuchtgas einströmen und verschließt es luftdicht. Rudolf (30), der die Ehrlich'sche Methode nachprüfte, sah in mit Leuchtgas gefüllten Röhrchen schon nach 2 bis 3 Tagen deutliches Wachstum, in solchen mit einfachem Paraffinverschluß erst nach 6 bis 10 Tagen. Frisch (12) und Rohonyi (28) geben ebenfalls dem Ehrlich'schen Verfahren den Vorzug vor anderen. Nach Roch (27) ist die Züchtung unter Leuchtgas dem einfachen Paraffinverschluß überlegen. Begleitbakterien werden zurückgedrängt, das Wachstum des Abortusbazillus gefördert.

Stafseth (34) empfiehlt, aus dem Gefäß, in dem sich die Kulturen befinden, mit einer Saugpumpe die Luft teilweise zu entfernen. Die Nowak'sche Subtilis-Methode biete diesem einfacheren und bequemeren Verfahren gegenüber keine Vorteile. Ispolatow (20) verwendet neben dem einfachen Paraffinverschluß die Stafseth'sche Methode. Zwick (47) hält sie für nicht empfehlenswert.

Eine Methode, nach der der Bazillus ohne Zusätze zur Luft in einem luftdicht abgeschlossenen Raum sich selbst überlassen wird, ist die von Büchli (3) eingeführte Paraffinverschluß-Methode. Nach Eber (6) ist die Züchtung leicht auf den üblichen schrägen Nährböden mit Paraffinverschluß. Wird das Röhrchen sofort nach der Beimpfung abgedichtet, so schießen innerhalb 6—10 Tagen die typischen Bangkolonien auf der Oberfläche empor. Witte (44) fand zwar die Nowak'sche Subtilis-Methode besser, doch gelang auch mit Paraffinverschluß die Züchtung verhältnismäßig leicht. Zwick (47) benutzte mit Erfolg neben der Nowak'schen Methode mit Paraffin verschlossene Kulturröhrchen. Stoß gibt in Stang-Wirth (32) als Züchtungsver-

fahren den Paraffinverschluß an. Auch Ossberger (25) arbeitete damit. Ispolatow (20) wendet es neben dem Stafseth-Verfahren an. Drescher und Hopfengärtner (4) verimpften ursprünglich schwach aufgehende Kolonien auf Nährböden mit Paraffinverschluß und erzielten dann immer kräftiges Wachstum.

Schon Bang und Stribolt (zit. 16) fanden, daß der Abortusbazillus mit der Zeit an aerobe Verhältnisse gewöhnt werden kann. Nach Mc. Fadyean und Stockman (zit. 16) zeigt er bereits in der ersten Generation aerobes Wachstum. Demgegenüber stellt Harms (14) fest, daß er in den ersten Generationen nach Isolierung aus dem Tierkörper nicht leicht aerob wächst. Nach Smith (38) weist das Kohlensäurebedürfnis frisch gezüchteter Stämme erhebliche Unterschiede auf.

Über das dem Abortusbazillus passendste Nährsubstrat liegen eine große Menge Veröffentlichungen vor. Flüssige und feste Nährböden, mit und ohne Zusatz von Kohlehydraten, von Serum oder Amnionflüssigkeit werden in mannigfaltiger Zusammensetzung verwendet.

Steck (39) fand in Peptonschottenagar-Plattenkultur winzige, punktförmige Kolonien unter der Oberfläche. Auch Smillie (36) züchtet auf Peptonagar. Stafseth (34) fand besseres und üppigeres Wachstum, wenn zur Herstellung der Nährböden statt Rindfleisch Milz oder Leber verwendet wurde. Milznährböden ließen sich durch Zusatz von 1% Stärke oder 1% Dextrose noch verbessern. In Lebernährböden war der Zusatz von Kohlehydraten nicht notwendig. Huddleson (18) züchtet auf Milz- oder Leberagar, der bei der Herstellung nicht zu hoch erhitzt werden darf und durch Glaswolle filtriert wird. Eber (6) verwendet Glyzerinserum, Glyzerinagar und Traubenzuckeragar; Ehrlich (7) und Frisch (12) Glyzerinagar. Hopfengärtner (17) und Frieß (11) bedienen sich Traubenzucker-Glyzerin-Schrägagars. Nach Roch (27) sind zur Züchtung auf Traubenzucker-Glyzerin-Leber Schrägagar die Anlegung von mindestens vier Kulturröhrchen erforderlich. Giltner (zit. 46) empfiehlt, statt Rind- u. Pferdefleischbouillon Uterus, Eihäute, Feten, Amnionflüssigkeit u. fetale Ascitesflüssigkeit zur Herstellung der Nährmedien zu verwenden. Tüxon (zit. 46) fand in Uterusextraktbouillon üppigstes Gedeihen. Robinson (zit. 46) verwendet mit bestem Erfolg den von Stockman angegebenen Glukose-Glyzerin-Kartoffelagar. Stickel und Meyer (zit. 46) empfehlen einen in der Zusammenstellung etwas komplizierten Nährboden. Rindfleisch, Leber oder Plazenta wird gehackt mit zerkleinertem Schweinemagen und Salzsäure zusammen bei 50 Grad C 18 bis 24 Stunden lang der Selbstverdauung überlassen. Aus dem so gewonnenen Fleischwasser wird der Nähragar hergestellt. Nach Meyer

und Shaw (zit. 46) ist er vorzüglich. Auch Zeller (46) bestätigt die Güte desselben. Zeller (45) fand in flüssigem Serum und in Amnionflüssigkeit allein geringes Wachstum, in Peptonwasser schlechtes. In schräg erstarrtem Rinder- oder Pferdeserum mit oder ohne Glyzerinzusatz wuchs der Bazillus in Form eines feinen, makroskopisch kaum wahrnehmbaren, grauweißen, feuchtglänzenden Belages. Auf und in Gelatine bei Zimmertemperatur langsames und spärliches Wachstum. Auf Endo-Agar war es leidlich krättig, auf Drigalski-Agar gut. Auf gewöhnlicher und Glyzerinkartoffel wuchs der Erreger langsam und spärlich. Rudolf (30) sah auf 2prozentigem Traubenzucker-Schrägagar deutliches Wachstum. Kristensen (21) versuchte Glukose-Zitrat-Ascites-Bouillon, Pferdeserum- und Leberbouillon. Mit letzterer hatte er die besten Resultate. Auch Zeller (46) erzielte auf Leber-Agar besonders gutes Wachstum. Ispolatow (20) bediente sich der Aussaat in geschmolzenem Agar, der sich nach Feststellung des Diseropetowsker veterinär-bakteriologischen Institutes besser eignet als einfacher Leber-Agar, Serum-Agar und der Nährboden von Bang und Stribolt. Lerche (24) züchtete auf Kalbfleisch-Agar von pH : 7,3 und Conradi-Drigalski Nährboden. Auf Leber-Agar erreichte er gutes Wachstum.

Nach Hutyra-Marek (19) gelingt die Kultur in einem Gemisch von Agar, Gelatine und Blutserum oder Amnionflüssigkeit. Zwick und Zeller (50) versuchten eine Reihe von Nährböden: Gewöhnlichen Fleischwasser-Pepton-Gelatine-Agar mit Zusatz von sterilem Rinderserum oder Amnionflüssigkeit (Schüttelkultur), gewöhnlichen Fleischwasser-Pepton-Gelatine-Agar (schräg erstarrt). Fleischwasser-Pepton-Bouillon mit oder ohne Zusatz von sterilem Rinderserum oder Amnionflüssigkeit unter Beigabe von Glyzerin und Traubenzucker (in Erlemeyerkölbchen). Bei Zugabe von sterilem Rinderserum oder Amnionflüssigkeit zeigt sich schnelleres und üppigeres Wachstum. Evans (8) züchtete auf Milchzucker-Agar, dem bei 50 Grad C 10 Prozent steriles Rinderserum zugesetzt wurden. Am Reichsseruminstitut (Holland) wird nach Büchli (3) schräg erstarrter oder in große Petrischalen ausgegossener Rinderserum-Agar verwendet. Zeller (45) stellte fest, daß durch Zusatz von Serum, Amnionflüssigkeit; Glyzerin und Traubenzucker zu Peptonbouillon stärkeres Wachstum zu erhalten war als in Peptonbouillon allein. Nach Fitch (9) wächst der Abortusbazillus am besten auf Rindfleisch-Agar, dem 10% frisches steriles Pferdeserum zugesetzt wurde. Jspolatow (20) verwendet Leber-Agar nach Löwenthal mit Zusatz von Blut. Das Blut wird in den heißen Agar gegossen und das Blutgerinnsel dann abfiltriert. Drescher und Hopfengärtner (4) züchteten auf Traubenzucker-

Glyzerin-Amnion-Agar in Plattenform mit gutem Erfolg. Lerche (24) verwendet auch Milchzucker-Serum-Agar, Serum-Agar und Traubenzucker-Serum-Agar.

Aus den Untersuchungen von Stickdorn (40) ist zu schließen, daß der Wasserstoffjonenkonzentration des Nährbodens ein bedeutender Einfluß auf das Wachstum zuzumessen ist. Er stellte die Vegetationsgrenzen mit pH: 7,0 und pH: 8,2 fest. Das Optimum lag zwischen 7,2 und 7,3. Nach Huddleson (18) ist das Wachstum abhängig vom pH-Gehalt. Er gibt als optimale Konzentration pH: 6,4 bis pH: 6,8 an; Mayer und Shaw (zit. 46) 7,2 bis 7,4; Harms (14) 6,6 bis 7,0; Zeller (46) 7,3 bis 7,5 Zeller ist der Ansicht, daß der Bazillus mehr alkali- als säuretolerant ist.

Görttler (13) versuchte durch Anreicherung des Materials den Kulturversuch aussichtsreicher zu gestalten. Er zentrifugierte den Labmageninhalt abortierter Feten 10 bis 15 Minuten lang bei 3000 Umdrehungen und hatte, indem er den Bodensatz als Aussaatmaterial benützte, in 45% der Fälle Erfolg; ohne Zentrifugieren aber nur in 20% der Fälle. Nach Prillwitz (26) hat sich zur Anreicherung das Beimpfen von Bouillonröhrchen, die zusammen mit Coli in luftdicht verschlossenem Gefäß aufbewahrt wurden, nicht bewährt.

Da der langsam wachsende Abortusbazillus oft von der Begleitflora überwuchert wird, versuchte man durch geeignete Zusätze zu den Nährböden die Begleitbakterien zu vernichten oder wenigstens im Wachstum zu hemmen. Braun u. Schäffer (zit. 46) fanden, daß Proteus durch geringen Karbolsäurezusatz zum Nährboden gehemmt wird; Kolle, Kraus, Uhlenhuth (22) geben hierzu einen 0,1 prozentigen Karbolsäure-Agar an. Zeller (46) empfiehlt bei Verarbeitung verunreinigten Organmaterials einen Zusatz von Gentianaviolett oder Dahlia 1: 10 000 zum Nährboden, Stafseth und Huddleson (35) Gentianaviolett 1: 10 000. Nach Ispolatow (20) hemmt ein Zusatz von Gentianaviolett 1: 50 000 das Wachstum der Begleitflora, eine stärkere Lösung aber auch das des Abortusbazillus. Drescher und Hopfengärtner (4) fanden, daß ein Zusatz von Gentianaviolett oder Karbolsäure zum Nährboden auch die Abortusbazillen hemmt. Zu dem gleichen Ergebnis kam mit Gentianaviolett auch Lerche (24). Weigmann (41) fand Kristallviolett, Malachitgrün und Brillantgrün nicht geeignet, da auch die Entwicklung des Abortusbazillus gehemmt wurde. Pikrinsäure wirkte weder auf Bazillus Bang noch auf die Begleitflora. Ein Zusatz von 0,1 ccm einer gesättigten wässerigen Lösung von Gentianaviolett zu 200 ccm Agar hemmte Staphylokokken und Streptokokken, nicht aber die Abortusbazillen. Haupt (15) setzt seinem Nährboden 1% einer 1,5 prozentigen Bromthymolblaulösung in Alkohol

und für je 8 bis 10 Platten 0,2 ccm einer 1prozentigen alkoholischen Lösung von basischem Fuchsin zu.

Ein anderer Weg die Begleitflora zu vernichten bezw. abzuschwächen, ist die Vorbehandlung des Organmaterials mit Desinfektionsmitteln. Zu diesem Zwecke mußte vor allen Dingen die Resistenz des Abortusbazillus, diesen Desinfektionsmitteln gegenüber festgestellt werden. Zwick und Wedemann (49) hatten folgende Ergebnisse: Der Abortusbazillus wurde getötet durch 2,5prozentige Kresolseifenlösung nach 50 Minuten, durch 5prozentige nach 30 Minuten, durch 1prozentige Kresolschwefelsäurelösung nach 20 Minuten, durch 2 bis 3prozentige nach 5 Minuten; durch 2,5prozentiges Formalin (= 1prozentiges Formaldehyd) nach 40 Minuten; durch Kalkmilch 1:20 nach $3^1/_2$ Stunden, durch Chlorkalkmilch 1:20 nach 80 Minuten; durch 3prozentige Karbolsäurelösung nach 100 Minuten; durch 2prozentige Salzsäurelösung, die 10% Kochsalz gelöst enthielt, und durch 1prozentige Salzsäurelösung, die 8% Kochsalz gelöst enthielt, bei einer Temperatur von 15 bis 20 Grad C nach $^1/_4$ Minute. Die Ergebnisse Büchlis (3), der mit den gleichen Desinfektionsmitteln arbeitete, decken sich fast genau mit den von Zwick und Wedemann erzielten.

B. Eigene Versuche.

Es galt festzustellen, mit welchem Verfahren der Bazillus abortus Bang am leichtesten gezüchtet werden kann.

Nachdem in den letzten Jahren die Abortus-Infektion des Menschen immer weiter in den Vordergrund des Interesses rückt, fällt der Veterinärhygiene die Aufgabe zu, die vom Tier ausgehenden Infektionsquellen zu ermitteln. Es dürfte Aufgabe der Bakteriologischen Institute sein, die Ausscheidung von Abortusbazillen in tierischen Se- und Exkreten zum Gegenstand eingehender Forschungen zu machen. Zu diesem Zwecke ist eine Prüfung der Frage vordringlich, mit welchem Verfahren der Nachweis der Abortusbazillen sicher, einfach und billig, unter möglichster Zurückhaltung des Wachstums der Begleit-

bakterien gelingt. Meine Versuche sollen an der Lösung dieser Frage mitwirken, wobei aber von vorneherein nicht an eine restlose Klärung der Frage gedacht werden konnte.

Vorbemerkungen.

Um Wiederholungen in den nachfolgenden Versuchen zu vermeiden, mögen im folgenden einige Ausführungen vorausgeschickt werden, die ganz allgemein für sämtliche Versuche gelten. Die folgenden Angaben beziehen sich auf das Ansetzen der Versuche, das Untersuchungsmaterial, dessen Prüfung, die Nährböden, die Züchtungsmethoden, sonstige Versuchsbedingungen, die Fortführung und Beobachtung der Versuche sowie deren Bewertung.

I. Das Ansetzen der Versuche.

Wegen des großen Umfanges einzelner Versuche war es nicht möglich, jeweils einen ganzen Versuch mit den verschiedenen Einzelfällen des Untersuchungsmaterials am gleichen Tage zu beginnen. Dazu hätten die Apparate, die Gerätschaften und Instrumente der Anstalt nicht ausgereicht; auch konnte die Nährbodenbereitung in diesem Umfang nicht auf einmal durchgeführt werden. Dazu stand nicht jeden Tag in Einsendungen an die Anstalt genügend Organmaterial zur Verfügung, sodaß sich schon aus diesem Grunde der Versuchsbeginn nicht auf einen Tag zusammen drängen ließ. Diese Umstände machten es notwendig, den Beginn der Einzelversuche auf einen längeren Zeitraum auszudehnen.

II. Untersuchungsmaterial.

Es wurde mit Kultur- und mit Organmaterial gearbeitet.

1. Kulturmaterial: Kulturen wurden zu den Vorversuchen beigezogen. Es galt dabei festzustellen, ob und inwieweit Reinkulturen auf den verschiedenen Nährböden wachsen

oder durch die verschiedenen Versuchsbedingungen beeinflußt werden.

Es standen 4 Laboratoriumskulturen, 2 älterer und 2 jüngerer Herkunft zur Verfügung. Die jüngeren Kulturen B. 284 und B. 286 wurden im Dezember 1930 aus 2 Rinderfeten (Labmagenschleimhaut) auf Drigalskiagar mit der Leuchtgasmethode isoliert; die Weiterzüchtung geschah auf Traubenzucker-Glyzerin-Schrägagar von pH : 7,4. Bis zur Verwendung in meinen Versuchen waren die beiden Kulturen insgesamt nur zweimal über Nährböden passiert worden. Beide Kulturen zeigten ein außerordentlich zartes Wachstum und benötigten aerob 8 bis 10 Tage bis zum völligen Überwachsen des Schrägagars. Die Kulturen B. 3 und B. 7 wurden im Jahre 1925 aus 2 abortierten Rinderfeten (Labmageninhalt) auf Traubenzucker-Glyzerin-Leber-Schrägagar unter Paraffinverschluß isoliert; die Weiterzüchtung geschah in achtwöchigen Zwischenräumen auf dem gleichen Nährboden. Wegen seines üppigen Wachstums wurde vor allem die Kultur B. 7 zu den weiteren Vorversuchen beigezogen.

Sämtliche Kulturen waren also bereits seit längerer oder kürzerer Zeit an aerobes Wachstum gewöhnt.

In meinen Versuchen wurde jeweils eine Platinöse (3 mm Durchmesser) Kulturmaterial aus Schrägagar-Röhrchen (Traubenzucker-Glyzerin-Leber-Agar) entnommen und in 1 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung verrieben. Von dieser Aufschwemmung wurde eine Platinöse voll auf den zu prüfenden Kulturplatten ausgestrichen und möglichst gleichmäßig verteilt.

2. Organmaterial: Es wurden Rinderfeten, Eihäute, Uterussekrete sowie Milzen infizierter Meerschweinchen zu den Versuchen beigezogen. Das Material stand in den Einsendungen, die zur bakteriologischen Untersuchung an die Veterinärpolizeiliche Anstalt gelangten, zur Verfügung. Es wurde Material ausgesucht, das nach der mikroskopischen Prüfung Bakterien vom Aussehen der Abortusbazillen enthielt.

Die Milzen stammten von Meerschweinchen, die mit Kultur- oder mit verdächtigem Organmaterial intraperitoneal geimpft worden waren.

Es war möglich, daß das Untersuchungsmaterial keine Abortusbazillen enthielt, weil bei Anlegen der Kulturplatten die Prüfung im Impfversuch noch nicht abgeschlossen war.

Von den Feten wurde Labmageninhalt zusammen mit abgeschabtem Epithel der Labmagenschleimhaut verwendet, von den Eihäuten abortierter Rinderfeten die abgeschabte Oberfläche der Kotyledonen; die Uterussekrete, die kurz nach erfolgtem Abortus in sterilen Röhrchen aufgefangen worden waren, wurden als solche verwendet. Das so vorbereitete Organmaterial wurde unter Zusatz gleicher Mengen steriler physiologischer Kochsalzlösung in steriler Reibschale verrieben. Von diesem Material wurde je eine Platinöse (3 mm Durchmesser) auf die zu prüfenden Kulturplatten verbracht und dort mit der Öse selbst oder mit einem flachaufliegenden Platindraht gleichmäßig ausgebreitet. Die Meerschweinchen-Milzen wurden den 14 bis 53 Tage nach der Impfung getöteten Tieren entnommen; mit einer Pinzette wurden kleinste Teilchen abgetrennt und dieses Material ohne weiteres auf den Kulturplatten verrieben.

III. Prüfung des Untersuchungsmaterials.

Hierzu wurde der Impfversuch am Meerschweinchen beigezogen.

Das Kulturmaterial wurde nur einmal geprüft (Vorversuch 1). Mit jeder Kulturverreibung, hergestellt wie oben unter II, 1 beschrieben — statt Kochsalzlösung wurde hier aber sterile Bouillon verwendet — wurden 5 Meerschweinchen intraperitoneal (1 ccm) infiziert.

Das Organmaterial wurde in allen Fällen — abgesehen von einem Fall (F. 99), wegen vorliegender hochgradiger Fäulnis — auf 5 bezw. 3 Meerschweinchen intraperitoneal verimpft. Auch hier wurde 1 ccm der Organmaterialaufschwemmung, wie sie

auf den Kulturplatten zum Ausstrich gelangte, verwendet. Bei vorbehandeltem Untersuchungsmaterial wurde zwecks Verimpfung der Rest des zentrifugierten Bodensatzes mit 1 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Gingen sämtliche mit dem Organmaterial primär geimpften Meerschweinchen interkurrent zu Grunde, so wurden weitere Meerschweinchen nachgeimpft. Zu diesem Zwecke wurde das Untersuchungsmaterial möglichst im Kühlraum aufbewahrt; in manchen Fällen konnte eine Nachimpfung allerdings nicht mehr vorgenommen werden, weil nicht genügend Material zur Verfügung stand. Nachdem in einem Versuch ermittelt worden war, daß die Impftiere das mit Alkohol vorbehandelte Organmaterial besser vertrugen, wurde weiterhin zur Nachimpfung nur so vorbehandeltes Material verwendet. Zur Vorbehandlung diente 20prozentiger Alkohol ohne Einwirkungszeit; wegen der Einzelheiten der Vorbehandlung wird auf Ziffer VI verwiesen.

Der Nachweis der gelungenen Infektion wurde bei allen Meerschweinchen durch die serologische Prüfung, bei einem Teil der Meerschweinchen außerdem durch das Kulturverfahren geführt.

Das zur serologischen Prüfung notwendige Blut wurde den Meerschweinchen verschiedene Zeit (14 bis 102 Tage) nach der Impfung mit Hilfe der Wasserstrahlluftpumpe aus der vorher angeschnittenen Ohrmuschel entnommen. Von den Tieren, die zwecks kultureller Prüfung getötet wurden, wurde Blut aufgefangen. Die Agglutination wurde mit der Gebrauchstest der Veterinärpolizeilichen Anstalt in den Verdünnungen von 1 : 10 bis 1 : 4000 durchgeführt. Die Röhrchen mit den Serum-Testmischungen blieben bei Zimmertemperatur stehen; das Ergebnis der Agglutination wurde nach 24 Stunden abgelesen. Als positives serologisches Ergebnis wurde der Titer 1 : 10 und höher, als negatives der Titer $<1 : 10$ angesprochen.

Der kulturelle Nachweis der gelungenen Infektion bei

den Meerschweinchen erfolgte im Rahmen der Prüfung der Meerschweinchen-Milzen im Kulturversuch, wie oben unter II, 2 beschrieben wurde.

Soweit Einzelfälle in mehreren Versuchen kulturell auf das Vorliegen von Abortusbazillen geprüft wurden, konnte auch das Ergebnis dieser Prüfungen zum Nachweis des Vorhandenseins von Abortusbazillen im Ausgangsmaterial beigezogen werden.

IV. Nährböden.

Es fanden Verwendung 8 Nährböden: Amnion-Agar, Drigalski-Agar, Kalbfleisch-Agar nach Lerche (24), Milchzucker-Agar nach Evans (8), Traubenzucker-Glyzerin-Leber-Agar, Zeller-Agar (45), Haupt-Agar (15), Huddleson-Agar (18). Es wurde also nur mit festen Nährböden gearbeitet im Interesse einer leichten Differenzierung der Kolonien.

Die Zubereitung der einzelnen Nährböden war folgende:

1. Amnion-Agar: Zerkleinerte Leber wird mit 1 Liter Wasserleitungswasser je Pfund versetzt. Das Gemisch bleibt 24 Stunden stehen. Hierauf wird eine halbe Stunde lang gekocht und dann abfiltriert. Dem noch heißen Leberwasser werden zugesetzt: Gleiche Teile von Amnionflüssigkeit (konserviert mit 2% Chloroform), 2% flüssiges Pepton, 0,3% NaCl, 0,2 % Na_2HPO_4 und 2 ½ % zerkleinerter Agar-Agar. Durch Zusatz von gesättigter Sodalösung wird unter Beiziehung des Comparators nach Michaeli auf pH : 7,4 eingestellt. Es folgt Erhitzen im Autoklaven bei ¾ Atmosphären Druck während einer halben Stunde. Die Masse wird in der Wärme (Dampftopf) durch Filtrierpapier gegeben. Der Nährboden wird in mit Wattebauschen verschlossene Reagenzgläser abgefüllt (je 15 ccm) und darin 3 Tage nacheinander in strömendem Wasserdampf (je eine halbe Stunde) sterilisiert. Der gebrauchsfertige Nährboden wird im Kühlraum aufbewahrt.

2. Drigalski-Agar: Rindfleischwasser (1 Pfund zerkleinertes

Rindfleisch auf 1 Liter Leitungswasser, gekocht und filtriert); Zusätze: 2 % flüssiges Pepton, 0,3 % NaCl, 0,2 % Na_2HPO_4, 2,5 % Agar-Agar; Einstellung auf pH : 7,4 bis 7,6; halbstündiges Erhitzen bei ¾ Atmosphären Dampfdruck; Filtrieren; Zusatz von 15 % Lakmuslösung (nach Kübel-Thiemann) und von 1,5 % Milchzucker; Zusatz von 10 % Sodalösung in einem Glaskolben, bis beim Schütteln der Schaum blauviolette Färbung zeigt; Zusatz von 1 % Kristallviolettlösung (0,1 prozentig); Abfüllen in Reagenzgläschen (je 15 ccm); einmaliges Sterilisieren in strömendem Wasserdampf (eine halbe Stunde); Aufbewahren im Kühlraum.

3. Kalbfleisch-Agar: Kalbfleischwasser (1 Pfund zerkleinertes Kalbfleisch auf 1 Liter Leitungswasser, gekocht und filtriert); Zusätze: 2 % flüssiges Pepton, 0,3 % NaCl, 0,2 % Na_2HPO_4, 2,5 % Agar-Agar; Einstellen auf pH : 7,4; halbstündiges Erhitzen bei ¾ Atmosphären Dampfdruck; Filtrieren; Abfüllen in Reagenzgläschen (je 15 ccm); 3 Tage nacheinander in strömendem Wasserdampf (½ Stunde) sterilisieren; Aufbewahren im Kühlraum.

4. Milchzucker-Agar: Rindfleischwasser (1 Pfund zerkleinertes Rindfleisch auf 1 Liter Leitungswasser, gekocht und filtriert); Zusätze: 2 % flüssiges Pepton, 0,3 % NaCl; 0,2 % Na_2HPO_4, 2 % Agar-Agar; Einstellen auf pH : 7,4; halbstündiges Erhitzen unter ¾ Atmosphären Dampfdruck; Filtrieren; Zusatz von 1 % Milchzucker; Abfüllen in Reagenzgläschen (je 15 ccm); drei Tage nacheinander in strömendem Dampf (eine halbe Stunde) sterilisieren; Aufbewahren im Kühlraum. Der Zusatz von 10 % sterilem Rinderserum erfolgte beim Ausgießen des Nährbodens in Petrischalen. Zur Gewinnung des Serums wurde aus der Jugularis eines Rindes unter sterilen Kautelen Blut entnommen. Das Blut wurde in sterilem Zylinder bei Zimmertemperatur aufbewahrt und nach der Gerinnung der Blutkuchen mit steriler Pipette von der Glaswand gelöst. Das abgesetzte Serum wurde immer frisch verwendet.

5. Leber-Agar: (Traubenzucker-Glyzerin-Leber-Agar): Leberwasser (ein Pfund zerkleinerte Leber auf 1 Liter Leitungswasser, gekocht und filtriert); Zusätze: 2 % flüssiges Pepton, 0,3 % NaCl, 0,2 % Na_2HPO_4, 2,5 % Agar-Agar; Einstellen auf pH: 7,4; halbstündiges Erhitzen unter ¾ Atmosphären Dampfdruck; Filtrieren; Zugabe von 2 % Glyzerin; 0,5 % Traubenzucker; 3 Tage nacheinander in strömendem Dampf (eine halbe Stunde) sterilisieren; Aufbewahren im Kühlraum.

6. Zeller-Agar: Rindfleischwasser (1 Pfund zerkleinertes Rindfleisch auf 1 Liter Leitungswasser, gekocht und filtriert); Zusätze: 2 % flüssiges Pepton, 0,3 % NaCl, 0,2 % Na_2HPO_4, 2 % Agar-Agar; Einstellen auf pH: 7,4; halbstündiges Erhitzen unter ¾ Atmosphären Dampfdruck; Filtrieren; Zugabe von 1 % Traubenzucker; Abfüllen in Reagenzgläschen (je 15 ccm); 3 Tage nacheinander in strömendem Dampf (eine halbe Stunde) sterilisieren; Aufbewahren im Kühlraum; beim Ausgießen in Petrischalen Zusatz von 10 % sterilem Rinderserum. Die Gewinnung des Serums wurde unter 4. beschrieben.

7. Haupt-Agar: Rindfleischwasser (1 Pfund zerkleinertes Rindfleisch auf 1 Liter Leitungswasser, gekocht und filtriert); (Haupt gibt Fleischextrakt an); Zusätze: 1 % flüssiges Pepton, 0,3 % NaCl, 0,2 % Sörrensens Phosphat ($Na_2HPO_4 + 2\,H_2O$), 2 % Agar-Agar, Einstellen auf pH: 6,8; halbstündiges Erhitzen unter ¾ Atmosphären Dampfdruck; Filtrieren; 1 % einer 1,5 prozentigen Bromthymolblaulösung in Alkohol (grasgrüne Farbe ist = ca. 6,8 pH); Abfüllen in Kölbchen; Aufbewahren im Kühlraum. Zum Gebrauch wurde 0,5 % Glukose und 0,2 % einer 1 prozentigen alkoholischen Lösung vom basischen Fuchsin zugesetzt; 10 Minuten langes Erhitzen auf 110 Grad (¾ Atmosphären Dampfdruck); Zusatz von 10 % sterilem Rinderserum.

8. Huddleson-Agar: Leberwasser (1 Pfund zerkleinerte Leber auf 1 Liter Leitungswasser, gekocht und filtriert); Zusätze: 2 % flüssiges Pepton, 0,3 % NaCl, 0,2 % Na_2HPO_4,

2,5 % Agar-Agar; Einstellen auf pH: 6,8; halbstündiges Erhitzen unter ¾ Atmosphären Dampfdruck; Filtrieren durch Glaswolle; Zusatz von: 2 % Glyzerin, 0,5 % Traubenzucker, Abfüllen in Reagenzgläschen (je 15 ccm); 3 Tage nacheinander in strömendem Dampf (eine halbe Stunde) sterilisieren; Aufbewahren im Kühlraum.

Bei Bedarf wurden die Nährböden im Wasserbad verflüssigt und in Petrischalen von 9,3 cm Durchmesser ausgegossen. Der Nährboden bedeckte damit den Boden der Petrischalen in einer Höhe von ungefähr 3 mm. Soweit den Nährböden beim Ausgießen Serum zugefügt wurde, wurde die Masse nach Verflüssigung im Wasserbad wieder auf 50 Grad abgekühlt, und ausgegossen, dann das Serum zugefügt und durch Schütteln vermischt.

Soweit den Nährböden Farblösungen (Dahlia, Malachitgrün, Gentianaviolett, Kristallviolett) oder Karbolsäure zugesetzt wurden, geschah dies nach dem Filtrieren der Nährböden und nach der Einstellung des pH-Gehaltes.

Die mit den Nährböden beschickten Petrischalen wurden ca. 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, um das oberflächliche Abtrocknen des Kondenswassers abzuwarten.

In der Regel wurde in den einzelnen Versuchen je eine Agarplatte, in einzelnen Versuchen auch 2 Platten und ausnahmsweise (Hauptversuch III) 3 Platten verwendet.

V. Züchtungsmethoden.

Es wurde nach den Methoden der Anaeroben-Züchtung und mit der der Aeroben-Züchtung gearbeitet. Die mit dem Untersuchungsmaterial beschickten Kulturplatten wurden in Weckgläser oder in Maaßen'sche Apparate umgekehrt eingesetzt. Ein Weckglas faßte je 8 Platten, ein Maaßen'scher Apparat je 12. Der Maaßen'sche Apparat besitzt eine Höhe von 30 cm und einen Durchmesser von 16,5 cm; ein eingeschliffener Glasstöpsel in dem Verschlußdeckel trägt in seinem Innern ein Absauge- bezw. Einleitungsrohr, das mit einem

Glashahn verschließbar ist. Der luftdichte Verschluß des Apparates erfolgte durch leichtes Bestreichen des geschliffenen Deckelrandes mit Staufferfett (konsistentes Fett). Die Weckgläser besitzen ein Fassungsvermögen von 3½ Liter, bei 25 cm Höhe und 15 cm Durchmesser; sie werden mit einem Gummiring und einer über den Deckel gelegten federnden Metallspange abgedichtet.

Im einzelnen ist noch folgendes anzugeben:

1. Leuchtgas: Es wurde der Gasleitung im Laboratorium entnommen. Das Leuchtgas wurde dem Maaßen'schen Apparat durch das Zuleitungsrohr, das durch einen Gummischlauch bis zum Boden verlängert war, zugeführt. Um der Luft im Apparat das Entweichen zu ermöglichen wurde der Deckel nur lose aufgesetzt. Erst wenn starker Gasgeruch sich bemerkbar machte, wurde der Deckel durch starken Druck und drehende Bewegung fest aufgepreßt und gleichzeitig die Gaszufuhr eingestellt.

2. Luftverdünnung: Zum Evakuieren diente die Oelpumpe nach Pfeiffer. Das Ableitungsrohr des Maaßen'schen Apparates wurde durch einen Gummischlauch mit der Luftpumpe verbunden. Die Luftverdünnung wurde bis zu 10 mm Quecksilberdruck durchgeführt; der Quecksilberdruck konnte an einem in das System eingeschalteten Manometer abgelesen werden.

3. Coli-Symbiose: Neben den Kulturplatten wurden in Weckgläser 20 Schrägagar-Röhrchen eingesetzt, die frisch mit Colibazillen beimpft und mit Wattebauschen verschlossen waren. Der Nährboden bestand aus 2prozentigem Pferdefleisch-Agar.

4. Technische Kohlensäure: Die atmosphärische Luft im Weckglas wurde zu einem Zehntel ihres Raum-Volumens durch Kohlensäure ersetzt. Das Gas stand in einer Kohlensäure-Bombe wie sie auch zur Herstellung von Gefrierschnitten verwendet wird, zur Verfügung. Zum Abmessen der benötigten Menge

Kohlensäure (350 ccm) bediente ich mich des von Haupt beschriebenen Verfahrens: 2 Rollflaschen von 350 ccm Inhalt, von denen die eine mit Wasser gefüllt war, wurden mit doppelt durchbohrten Stöpseln versehen; durch jede Oeffnung wurde ein Glasrohr eingeführt, so zwar, daß in jeder Flasche das eine Glasrohr bis zum Boden hinabreichte, das andere aber mit dem unteren Stöpselrand abschnitt. Die bis zum Boden reichenden Glasrohre der beiden Flaschen wurden durch einen Gummischlauch miteinander verbunden. Ein weiterer Gummischlauch wurde an dem kurzen Glasrohr der mit Wasser gefüllten Flasche angesetzt und führte zur Kohlensäure-Bombe. Durch Oeffnen des Ventils der Bombe strömte Kohlensäure in die Flasche und verdrängte aus ihr das Wasser in die leere Flasche. Nachdem sämtliches Wasser verdrängt war, wurde das Ventil geschlossen und der mit einer Schlauchklemme abgeklemmte Zuführungsschlauch bis auf den Boden des mit Kulturplatten beschickten Weckglases gesenkt. Nach Entfernung der Schlauchklemme wurde das mit Wasser gefüllte Gefäß hochgestellt; durch die Heberwirkung strömte das Wasser in die mit Kohlensäure gefüllte Flasche zurück und verdrängte so die Kohlensäure in das Weckglas; dieses wurde nach Herausnehmen des Schlauches verschlossen.

5. Naszierende Kohlensäure: Die Kohlensäure wurde nach dem Verfahren von Huddleson erzeugt. Die Kulturplatten wurden in ein Weckglas gebracht; durch Unterlegen eines Petrischalendeckels wurde dafür gesorgt, daß die unterste Kulturplatte nicht unmittelbar auf dem Boden des Weckglases ruhte. Darauf wurde das Weckglas schief gestellt und auf den tiefsten Punkt des Bodens 40 Gramm doppeltkohlensaures Natron verbracht. Nach Neigen des Weckglases nach der anderen Seite, wurden 6 ccm von Normal-Schwefelsäure auf den jetzt tiefsten Punkt des Bodens gegossen. Der Deckel wurde lose aufgesetzt, danach durch Aufstellen des Weckglases der Zusammentritt der Natronverbindung und der

Schwefelsäure herbeigeführt und kurze Zeit danach der Deckel fest verschlossen. Die zugesetzte Menge der Schwefelsäure ist so berechnet, daß damit eben 10 Volum-Prozent Kohlensäure (350 ccm) entwickelt wurden. Das doppeltkohlensaure Natron war im Ueberschuß zugesetzt worden.

6. Aerobe Züchtung: Die mit dem Untersuchungsmaterial beschickten Kulturplatten wurden umgekehrt in den Brutschrank gestellt.

Die Züchtung der Bakterien erfolgte bei sämtlichen Züchtungsmethoden im Brutschrank bei 37 Grad C.

VI. Sonstige Versuchsbedingungen.

Es galt festzustellen, ob bestimmte Chemikalien die Begleitbakterien bei Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials so schädigen können, daß deren Wachstum auf den Nährböden ausbleibt oder doch wenigstens gehemmt wird. Dabei war auch zu prüfen, ob das Wachstum der Abortusbazillen selbst durch die Vorbehandlung nicht ungünstig beeinflußt wird. An Chemikalien wurden verwendet: Antiformin, Alkohol und Salzsäure, sowie verschiedene Farblösungen bezw. Karbolsäure. Die Konzentration und die Einwirkungszeit der Chemikalien wurde variiert. Zur Vorbehandlung des Kulturmaterials wurde jeweils eine Oese aus Schrägagar-Röhrchen in 1 ccm der obengenannten Chemikalien verschiedener Konzentration verrieben. Nach verschieden langer Einwirkungsdauer der Chemikalien bei einer Temperatur von 37 Grad C bezw. bei ausfallender Einwirkungsdauer unmittelbar nach dem Zusammenbringen der Kulturen mit den Chemikalien und kurzem Umschütteln, wurden die Bakterien auszentrifugiert, bis die überstehende Flüssigkeit vollkommen klar war (15 Minuten bei 1000 Umdrehungen). Dann wurde die überstehende Flüssigkeit abgegossen, der Bakterien-Bodensatz mit 1 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung durchgewaschen (Verquirlen mit der Platinöse), noch-

mals zentrifugiert und das Waschwasser abgeschüttet. Der verbliebene Bodensatz wurde ohne weitere Verdünnung auf die Nährböden ausgestrichen bezw. zur Impfung verwendet (siehe oben unter III). Die Vorbehandlung des Organmaterials vollzog sich auf die gleiche Art; nur wurde hier das Ausgangsmaterial statt mit physiologischer Kochsalzlösung mit der gleichen Menge der zur Vorbehandlung verwendeten Chemikalien verrieben.

Zum Nachweis, daß durch die gewählte Technik und das Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung allein das Wachstum der Abortusbazillen nicht beeinflußt werden konnte, wurde in einem Versuch die Vorbehandlung des Kulturmaterials nach gleicher Art, doch unter Beiziehung von physiologischer Kochsalzlösung an Stelle von Chemikalien vorgenommen.

Als Zusätze zu den Nährböden kamen neben Karbolsäure nur Farblösungen zur Verwendung; bei den Farblösungen wurde hierbei von einer Grundverdünnung (Lösung) von 1 : 100, bei Karbolsäure von einer Grundverdünnung von 1 : 10 ausgegangen. Die in meinen Versuchen angegebenen Verdünnungen beziehen sich auf das Mengenverhältnis zwischen dem Nährboden und der ungelösten Farbsubstanz bezw. der Karbolsäure in Substanz.

Beim Haupt-Agar wurde der pH-Gehalt variiert, indem durch Zusatz von gesättigter Sodalösung die Alkalität erhöht wurde (pH : 7,4).

In den Versuchen mit den Nährböden von Haupt und von Huddleson wurden die 3 Kulturplatten nicht mit der gleichen Menge von Ausgangsmaterial beschickt, sondern nach dem Ausstreichen des Materials auf einer Platte mit der gleichen Platinöse auf eine zweite Platte und von dieser auf eine dritte Platte übergegangen.

VII. Beobachtung und Fortführung der Versuche.

Die Glasgefäße mit den eingesetzten Kulturplatten wurden dreimal und zwar am dritten und sechsten sowie am neunten

Tag nach Ansetzen der Versuche dem Brutschrank entnommen und geöffnet. Dabei wurde festgestellt, ob auf den Platten Kolonien vom Aussehen der Bazillus abortus-Kolonien aufgegangen waren und in welcher ungefähren Menge. Desgleichen wurde festgestellt, ob und in welcher Menge Kolonien von Begleitbakterien vorhanden waren. Die Kolonien wurden mit der Platinöse abgenommen und mit einem Tropfen steriler physiologischer Kochsalzlösung auf einem Objektträger verrieben zwecks mikroskopischer Untersuchung. Zur Prüfung, ob die Kolonien vom Aussehen der Abortusbazillen-Kolonien (verdächtige Kolonien) aus Abortusbazillen bestanden, wurde nach Gram gefärbt, bei den übrigen Kolonien mit wässriger Methylenblaulösung.

Wurden so Kolonien ermittelt, die nach ihrem Wachstum, sowie nach dem Aussehen der Bazillen (Form und Färbbarkeit) als Abortusbazillen anzusprechen waren, so wurden diese Kolonien mit der Platinöse abgestochen und auf Leber-Schrägagar verbracht. Dieses Verfahren wurde bei jeder einzelnen Platte geübt. Die Schrägagar-Röhrchen wurden bei 37 ° bebrütet; in den ersten Versuchen unter aeroben Verhältnissen, später unter den gleichen anaeroben Bedingungen, unter denen die Kulturplatten gehalten waren, von denen die Kolonien stammten. Sobald die Oberfläche der Schrägagar-Röhrchen kräftig bewachsen war (zwischen 4 und 14 Tagen), wurde der Kulturrasen mit Karbol-Kochsalzlösung (0,85 % Kochsalzlösung, 0,55 % Acidum carbolicum liquefactum) abgeschwemmt. Die Aufschwemmung wurde mit der gleichen Flüssigkeit auf die Dichte der Gebrauchstest gebracht und dann mit einem Abortusserum bekannten Titers die Agglutination durchgeführt. Mit positivem Ausfall des Agglutinationsversuches war der Nachweis erbracht, daß die auf der gleichen Platte gewachsenen Kolonien vom Aussehen der abgestochenen Kolonien Abortusbazillen-Kolonien waren. Das Abstechen verdächtiger Kolonien von der gleichen Platte wurde mindestens 2 mal an zwei verschiedenen Beobachtungstagen vorgenommen.

Die Kolonien, die nach der mikroskopischen Untersuchung aus Begleitbakterien bestanden, wurden gekennzeichnet; sie wurden auf der äußeren Bodenfläche der Petrischale mit Fettstift umrissen. Durch weitere Beobachtung wurde ermittelt, ob sich die Kolonien ausdehnten und vermehrten. Wurde bei einer Beobachtung festgestellt, daß Platten von Begleitbakterien vollkommen überwuchert waren, so wurden diese vor endgültigem Ablauf des Versuches ausgeschieden.

Beim jedesmaligen Öffnen der Glasgefäße wurde erst geprüft, ob die anfänglichen Versuchsbedingungen noch gegeben waren. Die Anwesenheit des Leuchtgases wurde durch den Geruch nachgewiesen; bei dem evakuierten Glasgefäß wurde durch Öffnen des Deckelhahnes an dem Zischen der einströmenden Luft festgestellt, daß der Apparat dichtgehalten hatte; die mit Coli beeimpften Kulturröhrchen wurden auf ihr Wachstum geprüft; das Vorhandensein der Kohlensäure wurde dadurch erwiesen, daß ein brennendes Zündholz in dem frisch geöffneten Glasgefäß sofort erlosch. Bei allen Prüfungen konnte festgestellt werden, daß sich die Versuchsbedingungen in den einzelnen Gläsgefäßen niemals geändert hatten.

In Fortführung der Versuche wurden in den Glasgefäßen wieder die gleichen Versuchsbedingungen wie oben beschrieben hergestellt. Bei der Züchtungsmethode durch Coli-Symbiose wurden dabei wieder frisch mit Colibazillen beimpfte Schrägagarröhrchen eingebracht; bei der Züchtungsmethode mit nascierender Kohlensäure war nur jeweils der Zusatz von 6 ccm Normal-Schwefelsäure notwendig, da in das Weckglas von vorneherein doppeltkohlensaures Natron im Überschuß verbracht worden war.

Nachdem sich herausstellte, daß in den Glasgefäßen nach längerem Gebrauch Schimmelbildung eintrat, wurden die Gefäße jeweils vor Wiederverwendung mit 3prozentiger Kresollösung gefüllt, die einige Stunden darin verblieb; nach deren Ausschütten wurden die Glasgefäße gründlich getrocknet.

VIII. Bewertung der Versuche.

Das Ergebnis der jeweiligen Prüfung der Nährböden wurde an jedem Beobachtungstag in einem Versuchsprotokoll niedergelegt. In den gleichen Protokollen wurde vermerkt, wann Kolonien auf Schrägagar-Röhrchen abgestochen wurden, auch wurde darin das Ergebnis der serologischen Prüfung verzeichnet.

Zum Zwecke der Zuzammenstellung meiner Versuchsergebnisse in Tabellen mußte eine einfache Formel gefunden werden, aus der die Wüchsigkeit der Kolonien nach dem Grad und der Schnelligkeit ihres Wachstums hervorgeht. Der Grad des Wachstums (Anzahl und Größe der Kolonien) wurde durch unterschiedliche Zeichen festgelegt, je nachdem es sich um das Wachstum von Kolonien aus Kulturmaterial oder um das Wachstum von Abortusbazillen oder Begleitbakterien aus Organmaterial handelte. Die Wüchsigkeit des Kulturmaterials wurde in römischen Zahlen ausgedrückt: I = sehr gutes Wachstum, II = gutes Wachstum, III = schlechtes Wachstum, 0 = kein Wachstum; die Wüchsigkeit der Abortusbazillen aus Organmaterial wurde durch große Buchstaben ausgedrückt: A = sehr gutes Wachstum, B = gutes Wachstum, C = schlechtes Wachstum, 0 = kein Wachstum; die Wüchsigkeit der Begleitbakterien durch kleine Buchstaben: a = sehr gutes Wachstum, b = gutes Wachtum, c = schlechtes Wachstum, 0 = kein Wachstum.

Durch beigesetzte arabische Zahlen wurde zum Ausdruck gebracht, an welchem Beobachtungstag die betreffenden Kolonien festgestellt waren. Es bedeutet also: 3 = Wachstum nach dreitägiger Bebrütungsdauer, 6 = Wachstum nach sechstägiger Bebrütungsdauer, 9 = Wachstum nach neuntägiger Bebrütungsdauer zum erstenmal festgestellt.

In den Versuchen, in denen mehrere Kulturplatten gleicher Nährböden zur Anwendung kamen, wurde das Züchtungsergebnis so gewertet als ob nur eine Platte zum Versuch beigezogen worden wäre. Damit wurde eine gleichmäßige Grund-

lage für die vergleichsweise Gegenüberstellung der einzelnen Versuche trotz Verwendung mehrerer Platten geschaffen. Eine Ausnahme macht der Versuch III.; hier wurde wegen der oben unter VI beschriebenen Anzüchtungsvariation jede Platte einzeln bewertet.

Wenn Kulturplatten von Begleitbakterien in kurzer Zeit soweit überwuchert waren, daß sich das allenfallsige Wachstum von Abortusbazillen nicht feststellen ließ, mußten diese für die weitere Beobachtung ausscheiden. Das ist in den Tabellen durch einen Strich (—) zum Ausdruck gebracht. Es kann hier nicht behauptet werden, daß Abortusbazillen nicht aufgegangen sind. Wurden auf einer Platte Kolonien vom Aussehen der Abortusbazillenkolonien festgestellt, konnte aber die weitere Prüfung der Kolonien im serologischen Verfahren nicht vorgenommen werden, weil das Wachstum auf den Schrägagar-Röhrchen ausblieb oder durch das Überwuchern von Begleitbakterien verhindert wurde, so wurde hier das Versuchsergebnis durch ein Fragezeichen (?) gekennzeichnet; es konnte also nicht entschieden werden, ob Abortusbazillen-Kolonien vorlagen oder nicht. Auch bei der Feststellung von Begleitbakterien konnte das Ergebnis fraglich bleiben, wenn nämlich bei der Beobachtung nur verdächtige Kolonien festgestellt wurden, deren Weiterzüchtung auf Schrägagar aber nicht gelang; es mußte die Frage offen bleiben, ob es sich hier um Abortusbazillen oder Begleitbakterien gehandelt hat.

Soweit das Wachstum auf den Kulturplatten oder auf Schrägagar-Röhrchen durch Schimmelbildung behindert wurde, war eine Beobachtung von Abortusbazillen oder Begleitbakterien ausgeschlossen. In den Tabellen wurde dies jeweils durch Eintragung eines Striches zum Ausdruck gebracht. Die Schimmelbildung selbst wurde nicht als ein Wachstum von Begleitbakterien gewertet, sondern blieb als Zufallsbefund für die Bewertung außer Betracht.

An Abkürzungen wurde ferner gebraucht: p = positiv,

n = negativ, Ab. = Abortusbazillen, Bb. = Begleitbakterien.

Kein Wachstum (0) wurde nur dann vermerkt, wenn ein Wachstum von Abortusbazillen nach dem Verhalten der Begleitbakterien auf den Platten möglich gewesen wäre, wenn also bis zum sechsten Tage der Beobachtung nur etwa die Hälfte der Platte mit Begleitbakterien überwuchert war.

Das Ergebnis des Impfversuches wurde als positiv vermerkt, wenn auch nur eines der mit dem gleichen Untersuchungsmaterial geimpften Meerschweinchen bei der serologischen Prüfung einen Titer von 1:10 oder höher zeigte.

I. Versuch.

Es galt festzustellen, welches Wachstum die Abortusbazillen und auch die Begleitbakterien auf mehreren für weitere Versuche vorgesehenen Nährböden bei verschiedenen Züchtungsmethoden zeigen; besondere Varianten in Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials oder in Zusätzen zu den Nährböden kamen nicht zur Anwendung.

Es wurde mit Kulturmaterial und mit Organmaterial gearbeitet.

Vorversuch 1.

Versuchsanordnung.

1. Versuchsbeginn: 16. April 1931 (B. 3 und B. 7) und 21. April 1931 (B. 284 und B. 286).

2. Untersuchungsmaterial: Kultur B. 3, B. 7, B. 284, B. 286.

3. Prüfung des Untersuchungsmaterials: Mit jeder Kultur wurden fünf Meerschweinchen geimpft. Das Ergebnis des Impfversuches ist in der nachfolgenden Tabelle niedergelegt.

Das serologische Ergebnis war für alle 4 Kulturen, das kulturelle Ergebnis für Kultur B. 3 und B. 284 positiv.

4. Nährböden: Amnion-Agar, Drigalski-Agar, Kalbfleisch-

Impfversuch zu Vorversuch 1.

Untersuchungsmaterial	Ms. No.	Tag der Impfung	Verendet am	Verendet Tage p. i.	Serologische Prüfung am	Serologische Prüfung Tage p. i.	Serologische Prüfung Titer	Kulturelle Prüfung am	Kulturelle Prüfung Tage p. i.	Kulturelle Prüfung Ergebnis	Gesamtergebnis
Kultur	1	20. 4.	.	.	20. 5.	30	< 50	20. 5.	30	?	serologisch u. kulturell positiv
B. 3	2	20. 4.	.	.	20. 5.	30	100	20. 5.	30	?	
	3	20. 4.	.	.	26. 5.	36	< 50	26. 5.	36	0	
	4	20. 4.	.	.	26. 5.	36	75	26. 5.	36	p	
	5	20. 4.	.	.	15. 6.	52	75	15. 6.	52	—	
Kultur	6	20. 4.	.	.	31. 7.	102	4000	.	.	.	serolog. positiv, kulturell nicht geprüft
B. 7	7	20. 4.	.	.	31. 7.	102	4000	.	.	.	
	8	20. 4.	.	.	31. 7.	102	1000	.	.	.	
	9	20. 4.	10. 5.	20	.	.	.	.	.	.	
	10	20. 4.	.	.	31. 7.	102	2000	.	.	.	
Kultur	16	23. 4.	.	.	28. 5.	35	< 10	28. 5.	35	—	serologisch u. kulturell positiv
B. 284	17	23. 4.	.	.	28. 5.	35	100	28. 5.	35	p	
	18	23. 4.	.	.	5. 6.	43	50	5. 6.	43	p	
	19	23. 4.	24. 5.	31	.	.	.	.	.	.	
	20	23. 4.	17. 5.	24	.	.	.	.	.	.	
Kultur	21	23. 4.	.	.	5. 6.	43	100	5. 6.	43	—	serolog. positiv, kulturell ungeklärt
B. 286	22	23. 4.	5. 6.	43	.	.	.	.	.	.	
	23	23. 4.	.	.	15. 6.	53	75	15. 6.	53	—	
	24	23. 4.	.	.	31. 7.	99	100	.	.	.	
	25	23. 4.	.	.	31. 7.	99	40	.	.	.	

Agar, Milchzucker-Agar, Leber-Agar, Zeller-Agar. Es wurden von jedem Nährboden 2 Platten angelegt.

5. Züchtungsmethoden: Leuchtgas, Luftverdünnung, Coli-Symbiose, Aerob.

6. Sonstige Versuchsbedingungen: Keine.

Versuchsergebnis.

Das Versuchsergebnis ist in der Tabelle 1 niedergelegt.

Der Versuch hat folgendes ergeben:

Bewertung des Untersuchungsmaterials: Der Grad des Wachstums wird in der Hauptsache bestimmt von der Wüchsigkeit der einzelnen Kulturen: Die frische Kultur B. 286 zeigte mit sämtlichen Züchtungsmethoden und auf sämtlichen Nährböden (abgesehen von einem fraglichen Fall) ein sehr gutes Wachstum. Die frische Kultur B. 284 zeigte dagegen im Vergleich zu den übrigen Kulturen das schlechteste Wachstum. Die alten Laboratoriumskulturen B. 3 und B. 7 ließen die verschiedensten Grade von Wachstum erkennen.

Die Geschwindigkeit des Wachstums war auffallenderweise verhältnismäßig häufig bei den zwei alten Laboratoriumskulturen verzögert; nur bei diesen beiden Kulturen trat auf einer Reihe von Kulturplatten das Wachstum erst am sechsten Tage ein.

Bewertung der Züchtungsmethoden: Von den Züchtungsmethoden eignet sich am besten die aerobe. Zwischen den anaeroben Züchtungsmethoden lassen sich Unterschiede nicht feststellen; soweit sie vorhanden zu sein scheinen, sind sie nur durch die Unterschiede im Untersuchungsmaterial bedingt.

Bewertung der Nährböden: Die einzelnen Nährböden eignen sich gleichmäßig gut zur Züchtung der Abortusbazillen, wie das Verhalten der Kultur B. 286 erweist. Wachstumsunterschiede gehen nicht zu Lasten der Nährböden, sondern sind bedingt durch die unterschiedliche Wüchsigkeit des Kulturmaterials.

Tabelle 1.

Untersuchungsmaterial, Kultur:		B. 7	B. 3	B. 284	B. 286
Tage des Versuchsbeginnes:		16. 4.	16. 4.	21. 4.	21. 4.
Leuchtgas	Amnion - Agar	0	III_6	0	I_3
	Drigalski »	III_6	III_6	0	I_3
	Kalbfleisch »	III_6	III_6	0	I_3
	Milchzucker »	?	I_6	0	I_3
	Leber »	0	III_6	0	I_3
	Zeller »	I_6	0	0	I_3
Luft-	Amnion - Agar	III_6	III_6	0	I_3
verdünnung	Drigalski »	III_6	III_6	0	I_3
	Kalbfleisch »	I_6	I_6	0	I_3
	Milchzucker »	I_6	?	III_3	I_3
	Leber »	III_6	?	III_3	I_3
	Zeller »	I_6	I_3	III_3	I_3
Coli-	Amnion - Agar	III_6	II_3	0	I_3
Symbiose	Drigalski »	I_6	I_6	0	I_3
	Kalbfleisch »	?	I_6	0	I_3
	Milchzucker »	I_6	?	?	I_3
	Leber »	I_3	III_6	0	I_3
	Zeller »	I_3	I_6	III_3	I_3
Aërob	Amnion - Agar	I_3	I_3	?	I_3
	Drigalski »	I_3	I_3	?	I_3
	Kalbfleisch »	I_3	I_3	I_3	I_3
	Milchzucker »	I_3	?	I_3	I_3
	Leber »	I_3	I_3	I_3	?
	Zeller »	I_3	I_3	I_3	I_3

Hauptversuch I.

Versuchsanordnung.

1. Versuchsbeginn: In der Tabelle I angeführt.

2. Untersuchungsmaterial: 30 Einzelfälle (6 Feten, 5 Eihäute, 1 Uterussekret, 18 Milzen infizierter Meerschweinchen).

3. Prüfung des Untersuchungsmaterials: Mit dem Material aus Feten, Eihäuten und Uterussekret wurden je 5 bezw. 3 Meerschweinchen geimpft. Das Ergebnis des Impfversuches ist in der nachfolgenden Tabelle niedergelegt.

Der Impfversuch war (serologisch oder kulturell) positiv bei 8 Einzelfällen. (F. 64, F. 66, E. 70, E. 74, F. 78, E. 92, U. 96, E. 98).

Material von E. 92, U. 96, E. 96 und E. 98 wurde auch in dem Hauptversuch II (E. 98 außerdem in Hauptversuch III) geprüft; ein kulturelles Ergebnis wurde in keinem Falle erzielt.

Die 18 Meerschweinchen, deren Milzen als Untersuchungsmaterial dienten, wurden zur Zeit der Tötung (14 bis 53 Tage nach der Impfung) serologisch geprüft.

Das serologische Ergebnis war positiv bei 13 Meerschweinchen (Ms. 86, 76, 2, 46, 66, 17, 4, 37, 11, 18, 21, 5, 23). Die Meerschweinchen-Milzen wurden nur in Hauptversuch I kulturell geprüft.

Von den 30 Einzelfällen lieferten demnach 21 ein positives Ergebnis im Impfversuch; in 9 Einzelfällen ist nicht erwiesen, ob das Untersuchungsmaterial Abortusbazillen enthielt oder nicht.

4. Nährböden: Die gleichen wie in Vorversuch 1.

5. Züchtungsmethoden: Die gleichen wie in Vorversuch 1, doch ohne aerobe Züchtung.

6. Sonstige Versuchsbedingungen: Keine.

Versuchsergebnis.

Das Versuchsergebnis ist in der Tabelle I niedergelegt. Der Versuch hat folgendes ergeben:

Impfversuch zu Hauptversuch I.

Untersuchungsmaterial	Ms No.	Tag der Impfung	Tag der Nachimpf.	Vorbehandlung des Materials mit	Verendet am	Verendet Tage p. i.	Serologische Prüfung am	Serologische Prüfung Tage p. i.	Serologische Prüfung Titer	Kulturelle Prüfung am	Kulturelle Prüfung Tage p. i.	Kulturelle Prüfung Ergebnis	Gesamtergebnis
F. 64	11	20. 4.	—	—	—	—	29. 5.	39	600	29. 5.	39	?	serologisch positiv, kulturell fraglich.
	12	20. 4.	—	—	25. 4.	5	—	—	—	—	—	—	
	13	20. 4.	—	—	—	—	31. 7.	102	1000	—	—	—	
	14	20. 4.	—	—	3. 5.	13	—	—	—	—	—	—	
	15	20. 4.	—	—	—	—	31. 7.	102	4000	—	—	—	
F. 66	26	23. 4.	—	—	24. 5.	31	—	—	—	—	—	—	serologisch positiv, kulturell nicht geprüft.
	27	23. 4.	—	—	—	—	31. 7.	99	600	—	—	—	
	28	23. 4.	—	—	—	—	31. 7.	99	1000	—	—	—	
	29	23. 4.	—	—	11. 6.	49	—	—	—	—	—	—	
	30	23. 4.	—	—	—	—	31. 7.	99	600	—	—	—	
F. 69	31	28. 4.	—	—	30. 4.	2	—	—	—	—	—	—	serologisch und kulturell nicht geprüft
	32	28. 4.	—	—	30. 4.	2	—	—	—	—	—	—	
	33	28. 4.	—	—	30. 4.	2	—	—	—	—	—	—	
	34	28. 4.	—	—	29. 4.	1	—	—	—	—	—	—	
	35	28. 4.	—	—	29. 4.	1	—	—	—	—	—	—	
E. 70	36	28. 4.	—	—	13. 5.	15	—	—	—	—	—	—	serologisch und kulturell positiv.
	37	28. 4.	—	—	—	—	5. 6.	38	1000	5. 6.	38	p	
	38	28. 4.	—	—	25. 5.	27	—	—	—	—	—	—	
	39	28. 4.	—	—	—	—	31. 7.	94	4000	—	—	—	
	40	28. 4.	—	—	24. 5.	26	—	—	—	—	—	—	
E. 74	41	5. 5.	—	—	28. 5.	23	—	—	—	—	—	—	serologisch positiv, kulturell nicht geprüft
	42	5. 5.	—	—	—	—	31. 7.	87	10	—	—	—	
	43	5. 5.	—	—	—	—	31. 7.	87	10	—	—	—	
	44	5. 5.	—	—	—	—	31. 7.	87	400	—	—	—	
	45	5. 5.	—	—	10. 5.	5	—	—	—	—	—	—	
F. 78	46	11. 5.	—	—	—	—	15. 6.	31	1000	15. 6.	31	—	serologisch positiv, kulturell ungeklärt
	47	11. 5.	—	—	9. 6.	29	—	—	—	—	—	—	
	48	11. 5.	—	—	20. 5.	9	—	—	—	—	—	—	
	49	11. 5.	—	—	28. 5.	17	—	—	—	—	—	—	
	50	11. 5.	—	—	—	—	31. 7.	81	4000	—	—	—	
F. 83	51	19. 5.	—	—	20. 5.	1	—	—	—	—	—	—	serologisch und kulturell nicht geprüft
	52	19. 5.	—	—	20. 5.	1	—	—	—	—	—	—	
	53	19. 5.	—	—	20. 5.	1	—	—	—	—	—	—	
	54	19. 5.	—	—	20. 5.	1	—	—	—	—	—	—	
	55	19. 5.	—	—	20. 5.	1	—	—	—	—	—	—	
F. 85	56	19. 5.	—	—			5. 6.	17	<10	5. 6.	17	n	serologisch und kulturell negativ.
	57	19. 5.	—	—	—	—	15. 6.	27	<10	15. 6.	27	n	
	58	19. 5.	—	—	—	—	31. 7.	73	<10	—	—	—	
	59	19. 5.	—	—	—	—	31. 7.	73	<10	—	—	—	
	60	19. 5.	—	—		—	31. 7.	73	<10	—	—	—	
E. 92	61	11. 6.	—	—	12. 6.	1	—	—	—	—	—	—	serologisch und kulturell positiv
	62	11. 6.	—	—	12. 6.	1	—	—	—	—	—	—	
	63	11. 6.	—	—	13. 6.	2	—	—	—	—	—	—	
	64	11. 6.	—	—	12. 6.	1	—	—	—	—	—	—	
	65	11. 6.	—	—	12. 6.	1	—	—	—	—	—	—	
	66	—	12. 6.	Alkohol (20%) ohne Einwirkungszeit	—	—	15. 7.	33	100	15. 7.	33	p	
	67	—	12. 6.		—	—	31. 7.	49	800	—	—	—	
	68	—	12. 6.		—	—	31. 7.	49	1000	—	—	—	
	69	—	12. 6.		23. 6.	11	—	—	—	—	—	—	
	70	—	12. 6.		—	—	31. 7.	49	800	—	—	—	
	71	—	12. 6.	Antiformin (0,1%) bei 1¾ Stunden Einwirkungsdauer	13. 6.	1	—	—	—	—	—	—	
	72	—	12. 6.		—	—	31. 7.	49	100	—	—	—	
	73	—	12. 6.		—	—	31. 7.	49	400	—	—	—	
	74	—	12. 6.		13. 6.	1	—	—	—	—	—	—	
	75	—	12. 6.		—	—	31. 7.	49	200	—	—	—	
U. 96	76	22. 6.	—	—	—	—	15. 7.	23	100	15. 7.	23	p	serologisch und kulturell positiv.
	77	22. 6.	—	—	25. 6.	3	—	—	—	—	—	—	
	78	22. 6.	—	—	—	—	31. 7.	39	2000	—	—	—	
	79	22. 6.	—	—	—	—	31. 7.	39	800	—	—	—	
	80	22. 6.	—	—	—	—	31. 7.	39	2000	—	—	—	
E. 96	81	23. 6.	—	—	24. 6.	1	—	—	—	—	—	—	serologisch und kulturell nicht geprüft.
	82	23. 6.	—	—	24. 6.	1	—	—	—	—	—	—	
	83	23. 6.	—	—	24. 6.	1	—	—	—	—	—	—	
	84	23. 6.	—	—	24. 6.	1	—	—	—	—	—	—	
	85	23. 6.	—	—	25. 6.	2	—	—	—	—	—	—	
E. 98	86	9. 7.	—	—	—	—	23. 7.	14	10	23. 7.	14	n	serol pos., kult. negativ
	87	9. 7.	—	—	—	—	12. 8.	34	10	—	—	—	
	88	9. 7.	—	—	—	—	12. 8.	34	20	—	—	—	

Tabelle I.

Untersuchungsmaterial:			F 61	F. 66	F. 69	E. 70	E. 74	F. 78	F. 83	F. 85	E. 92	U. 96	E. 96	E. 98	M. 1	M. 2	M. 3	M. 4	M. 16	M. 17	M 11	M 18	M. 21	M. 37	M. 56	M. 5	M. 23	M. 46	M. 57	M. 66	M. 76	M.*) 86
Tage d. Versuchsbeginns:			20. 4.	22. 4.	28. 4	29 4	5. 5.	11. 5.	19. 5.	19. 5.	11. 6.	22. 6.	23. 6.	8. 7.	20. 5.	20. 5.	26. 5.	26. 5.	28. 5.	28 5.	29. 5.	5. 6.	5. 6.	5. 6.	5. 6.	15 6.	15. 6.	15 6.	15 7.	15. 7.	15 7.	23. 7.
Leucht-gas	Amnion-Agar	Ab.	A_3	–	–	–	0	–			–	–	–	–	–	–	–	–	0	0		–	–	–	–	–	–	A_3	?	0
		Bb.	as	as	as	as	as	bs	as	as	as	as	as	as	as	as	—	as	as	as	bs	as	as	as	as	as	as	as	?	?	cs
	Drigalski-Agar	Ab.	A_3	0	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	?	?	0	A_3	?	?	?	?	—	—	—	—	—	0	A_3	?	0
		Bb.	as	as	as	as	as	bs	as	as	as	as	as	as	?	?	0	cs	as	as	cs	bs	as	as	as	as	as	0	0	?	0
	Kalbfleisch-Agar	Ab.	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	?	—	0	—	—	A_3	—	A_3	–	–	–	–	–	–	0	A_6	A_6	0
		Bb.	as	as	a	as	as	bs	as	as	as	as	as	as	?	as	cs	as	as	as	as	as	as	as	as	cs	cs	cs	cs	cs	cs
	Milchzuck. Agar	Ab.	A_3	?	—	—	?	—	–	–	–	–	–	?	—	–	–	–	?	—	?	–	–	–	–	–	–	–	A_3	A_3	0
		Bb.	as	as	as	as	as	?	as	as	as	as	as	as	?	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	cs	—	cs
	Leber-Agar	Ab.	A_3	A_6	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	?	—	—	—	—	—	?	—	—	—	—	—	—	0	A_3	?	0
		Bb.	as	as	as	as	as	bs	as	as	as	as	as	as	?	as	as	as	as	as	as	?	as	—	as	as	as	as	cs	cs	as	bs
	Zeller-Agar	Ab.	?	0	—	—	?	—	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	?	–	–	–	–	–	–	0	—	A_3	B_6	–
		Bb.	?	as	as	as	as	bs	as	as	as	as	as	as	–	as	as	as	as	as	as	bs	as	as	as	as	as	as	as	cs	as	as
Luft-verdünnung	Amnion-Agar	Ab.	A_3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	–	—	—	—	—	—	—	?	—	—	—	—	—	0	–	—	—	0
		Bb	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	—	—	as
	Drigalski-Agar	Ab.	0	–	–	–	0	—	—	—	—	—	—	?	?	–	–	–	A_3	?	–	–	–	–	–	0	0	A_6	?	0
		Bb.	as	as	as	as	as	cs	as	as	as	as	as	as	?	?	as	as	as	?	as	as	as	as	as	as	0	as	0	—	?	as
	Kalbfleisch-Agar	Ab.	A_6	—	—	—	–	—	—	—	—	—	—	—	?	?	0	—	—	A_3	—	—	—	—	—	?	—	—	0	B_6	-	0
		Bb.	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	?	as	cs	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	cs	cs	—	as
	Milchzuck.-Agar	Ab.	A_3	—	—	—	—	?	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	0	?	—	0
		Bb.	?	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	—	as
	Leber-Agar	Ab.	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	A_3	—	—	—	—	—	0	—	0	0	?	—	—
		Bb.	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	bs	—	as
	Zeller-Agar	Ab	?	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	?	0	—	—	A_3	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—
		Bb.	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	bs	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	—	as
Coli-Symbiose	Amnion-Agar	Ab.	?	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	A_3	—	?	—	—	–	–	–	0	—	?	0
		Bb.	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	—	as	bs	as	—	as	–	as	as	as	as	as	as	as	cs	cs
	Drigalski-Agar	Ab.	?	?	–	–	0	–	–	0	–	–	?	?	0	–	0	A_3	?	–	–	?	–	–	–	–	0	?	?	0
		Bb.	?	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	?	?	cs	as	as	0	?	as	as	as	as	be	as	0	as	as	as
	Kalbfleisch-Agar	Ab.	0	A_6	—	—	–	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	A_3	0	A_3	—	A_3	—	0	—	0	—	?	?	0
		Bb.	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	bs	?	as	cs	as	bs	as	as	—	?	?	cs
	Milchzuck.-Agar	Ab.	0	?	—	—	—	?	—	—	—	—	–	–	?	—	—	—	—	?	—	A_3	—	?	—	—	—	—	—	?	A_3	0
		Bb.	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	?	as	as	as	?	as	as	as	as	—	?	?	cs
	Leber-Agar	Ab.	0	?	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	?	—	—	—	—	B_3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	?	A_3	0
		Bb.	as	bs	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	–	as	as	—	as	as	as	as	—	as	cs	as
	Zeller-Agar	Ab	A_3	—	—	—	?	—	—	—	—	—	—	?	—	—	—	—	A_3	—	?	—	A_3	—	—	—	0	—	A_3	—	0
		Bb.	cs	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	as	?	as	as	as	as	as	as	as	as	?	as	as	as	as	—	as	—	as
Ergebnis:			p	p	-	-	—	0	–	-	-	-	–	?	?	0	p		p	?	p		p	–	-			0	p	p	0
Ergebnis d. Impfversuchs:			p	p		p	p	p		n	p	p	—	p	?	p	?	p	n	p	p	p	p	p	n	p	p	p	n	p	p	p
weitere kulturelle Prüfungen:	i. Versuch									II	II	II	II, III																			
	Ergebnis									n	n	n	n																			
Geimpft mit:														K. 3	K. 3	K. 3	K. 3	K. 181	K. 281	F. 64	K. 281	K. 286	E. 70	F. 85	K. 3	K. 286	F. 78	F. 85	E. 92	E. 85	E. 98
Tötung? Tage post infectionem:														30	30	36	36	35	35	39	43	43	38	17	52	55	31	27	33	23	14

*) M = Meerschweinchen.

Bewertung des Untersuchungsmaterials: Unterziehen wir die 9 Einzelfälle, in denen ein Wachstum von Abortusbazillen nach dem Ausfall des Impfversuches nicht erwartet werden konnte, einer Betrachtung: In 6 Einzelfällen hatten hier auf den meisten Kulturplatten die Begleitbakterien stark überwuchert; nur in 2 Einzelfällen hätte daneben allenfallsiges Wachstum von Abortusbazillen festgestellt werden können, wenigstens auf einem großen Teil der Kulturplatten. In einem Einzelfall (Ms. 1) ist das Züchtungsergebnis als fraglich anzusprechen, weil hier auf einer größeren Anzahl von Kulturplatten Kolonien vom Wachstum der Abortusbazillen zwar aufgegangen sind, ihre Identifizierung im serologischen Verfahren aber nicht durchgeführt werden konnte. Diese 9 Fälle genügen also lediglich zu der Feststellung, daß dort, wo das Untersuchungsmaterial viel Begleitbakterien enthält, namentlich solche von raschem Wachstum, wegen des Überwucherns der Begleitbakterien der Züchtungsversuch aussichtslos erscheint. Damit ist das Züchtungsverfahren bei zwei Drittel dieser Einzelfälle von vorneherein als aussichtslos zu beurteilen, weil das Wachstum von Abortusbazillen, wenn solche vorhanden gewesen wären, der Beobachtung entgangen wäre.

21 Einzelfälle waren nach dem Ausfall des Impfversuches als abortusbazillenhaltig anzusprechen. Das kulturelle Versuchsergebnis war dabei folgendes: Überwuchern der Begleitbakterien in 9 Fällen; kein Wachstum in 2 Fällen; fragliches Ergebnis in 2 Fällen; ein positives Züchtungsergebnis wurde also nur in 8 Fällen von 21 (= 40 %) erzielt. 43 % der Fälle scheiden in dieser Gruppe wegen Überwucherns der Begleitbakterien von der Beurteilung aus.

Zu den 8 auf Abortusbazillen kulturell positiven Einzelfällen ist folgendes zu bemerken: Das Ergebnis des Kulturversuches ist auch im Hinblick auf die große Zahl der für den Einzelfall verwendeten Kulturplatten (je 18) im Vergleich zu der Zahl der Abortusbazillenbefunde als ein schlechtes zu bezeichnen. Es gelang die Züchtung auf 10 Platten in 1 Fall

(Ms. 17), auf 9 Platten in 1 Fall (Ms. 66), auf 8 Platten in 1 Fall (E. 64), auf 5 Platten in 1 Fall (Ms. 76), auf 3 Platten in 2 Fällen (F. 66 und Ms. 18), auf 2 Platten in 1 Fall (E. 64) und auf 1 Platte in 1 Fall (Ms. 4). Auf 378 Kulturplatten wurde also nur 41 mal (= 11%) Wachstum von Abortusbazillen erreicht. Soweit Wachstum festzustellen war, ist es als befriedigend zu bezeichnen. Es wurde auf der überwiegenden Mehrzahl der Kulturplatten (38) sehr gutes und nur auf 3 Platten gutes Wachstum festgestellt. Die Abortuskolonien wuchsen rasch: Auf 32 Platten war das Wachstum bereits am dritten Tag und nur auf 9 Platten erst am 6. festzustellen.

Bewertung der Züchtungsmethoden: Wesentliche Unterschiede in den Züchtungsmethoden sind nicht festzustellen; die 41 kulturell positiven Kulturplatten verteilen sich auf die Leuchtgasmethode mit 17, die Luftverdünnungsmethode mit 10, die Methode der Coli-Symbiose mit 14. Auf 43 Platten von im Impfversuch positiven Einzelfällen war das Wachstum der Begleitbakterien nicht so stark, daß nicht nebenbei ein Wachstum von Abortusbazillen hätte beobachtet werden können. Es kann also behauptet werden, daß hier das Wachstum der Abortusbazillen versagt hat. Die 43 Versager verteilen sich auf die einzelnen Züchtungsmethoden folgendermaßen: Leuchtgasmethode 14, Luftverdünnung 13, Coli-Symbiose 16.

Bewertung der Nährböden: Von den 41 Kulturplatten mit Abortusbazillen-Wachstum waren hergestellt mit Kalbfleisch-Agar 11, Zeller-Agar 8, Drigalski-Agar 6, Milchzucker-Agar 6, Leber-Agar 6, Amnion-Agar 4. Von den 43 Versagern treffen auf Drigalski-Agar 10, Kalbfleisch-Agar 9, Amnion- und Leber-Agar je 7, Milchzucker- und Zeller-Agar je 5.

Zusammenfassend kann festgestellt werden: Das in Hauptversuch I gewählte Züchtungsverfahren eignet sich nicht zur kulturellen Feststellung von Abortusbazillen in Organmaterial. Das Überwuchern der Begleitbakterien macht eine Beobachtung des Abortusbazillen-Wachstums unmöglich; es beeinträchtigt

auch das Wachstum der von den Kulturplatten zur Identifizierung abgestochenen und auf Schrägagar-Röhrchen überimpften Kolonien.

Das positive oder negative Ergebnis ist in der Hauptsache abhängig vom Untersuchungsmaterial, je nachdem dieses Begleitbakterien in einer größeren oder geringeren Menge enthält. Auch die Art der Begleitbakterien ist ausschlaggebend; Kokken überwachsen z. B. die Kulturplatten nicht so stark und nicht so rasch, als Kartoffelbazillen, Proteusbazillen und andere.

Wesentliche Unterschiede in den Züchtungsmethoden und Nährböden haben sich in diesem Versuch nicht ergeben.

II. Versuch.

Es galt festzustellen, ob durch die Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials mit verschiedenen Chemikalien das Wachstum der Begleitbakterien beeinträchtigt wird, so zwar, daß bei nachträglicher Anzüchtung auf Kulturplatten die Begleitbakterien nicht oder nur schwach angehen. Das Wachstum der Abortusbazillen sollte dabei natürlich nicht beeinträchtigt werden.

Als Chemikalien zur Vorbehandlung des Materials kamen zur Anwendung: Antiformin, Alkohol und Salzsäure. Es wurde mit Kulturmaterial und Organmaterial gearbeitet.

Vorversuch 2.

Versuchsanordnung.

1. Versuchsbeginn: Antiformin 7., 8., 12., 13., Mai 1931. Alkohol: 15. Mai 1931; Salzsäure: 27., 28. Mai, 1., 2. Juni 1931.

2. Untersuchungsmaterial: Kultur B. 7.

3. Prüfung des Untersuchungsmaterials: Eine besondere Prüfung im Impfversuch fand für diesen Versuch nicht statt.

Das Ergebnis des Impfversuches ist in der Versuchsanordnung zu Vorversuch 1 niedergelegt. Das serologische Ergebnis mit Kultur B. 7 war dort ein positives.

4. Nährböden: Amnion-Agar, Drigalski-Agar, Kalbfleisch-Agar, Milchzucker-Agar, Leber-Agar, Zeller-Agar. Es wurde von jedem Nährboden eine Platte angelegt.

5. Züchtungsmethoden: Aerob.

6. Sonstige Versuchsbedingungen: Das Untersuchungsmaterial wurde mit Antiformin in der Konzentration 0,1 — 0,2 — 0,3 — 0,4 — 0,5 — 1,0 — 2,0 — 3,0 — 4,0 — 5,0 Prozent bezw. mit Alkohol in der Konzentration 20 — 40 — 60 — 80 Prozent bezw. mit Salzsäure in der Konzentration 0,05 — 0,1 — 0,25 — 0,5 — 1,0 — 5,0 — 10,0 — 15,0 — 20,0 Prozent vorbehandelt. Die Chemikalien wirkten im Brutschrank von 37° C folgende Zeiten ein: Antiformin 0 — 1¾ — 3½ — 7 — 14 Stunden, Alkohol 0 — 1 — 2 — 4 Stunden, Salzsäure 0 — 1 — 2 Stunden. Wegen der weiteren Behandlung des Materials wird auf die Vorbemerkungen verwiesen.

Versuchsergebnis.

Das Versuchsergebnis ist in der Tabelle 2 a (Antiformin) und 2 b (Alkohol) niedergelegt. Das mit Salzsäure vorbehandelte Material wurde durch alle Salzsäurekonzentrationen auch ohne Einwirkungszeit schon so geschädigt, daß in der Folge auf keinem Nährboden mehr ein Wachstum eingetreten ist.

Im Übrigen hat der Versuch folgendes ergeben:

Vorbehandlung mit Antiformin: Bei Konzentrationen über 0,5 % wurden die Abortusbazillen auch bei kürzester Einwirkungsdauer so geschädigt, daß auf keinem Nährboden mehr ein Wachstum erfolgte (das Züchtungsergebnis des mit den höheren Konzentrationen vorbehandelten Untersuchungsmaterials wurde deshalb in der Tabelle 2 a weggelassen). Aus der Tabelle 2 a ist ersichtlich, daß nach Einwirkung des Antiformins in 0,1 prozentiger Konzentration während

Tabelle 2a.

Antiformin	0,1 %					0,2 %					0,3 %					0,4 %					0,5 %				
Tage des Versuchsbeginns	13.5	12.5.	12.5.	12.5.	8 5.	13.5.	12.5.	12.5.	12.5.	8.5.	13.5.	12 5.	12.5.	12.5.	8 5.	13 5	12.5	12 5.	12.5.	8.5.	13.5.	12 5	12.5.	12.5.	8.5.
Stunden der Einwirkungszeit	0	1¾	3½	7	14	0	1¾	3½	7	14	0	1¾	3½	7	14	0	1¾	3½	7	14	0	1¾	3½	7	14
Amnion-Agar	I3	I3	I6	III6	0	III9	0	0	II6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	III6	I3	0	0	III6	0	0
Drigalski-Agar	I3	I3	I3	I3	0	III6	I3	III6	I3	0	II6	III6	0	0	0	0	I3	I3	I3	I3	0	0	I3	0	0
Kalbfleisch-Agar	I3	I3	I3	II3	0	II3	I3	II3	I3	0	II6	I3	0	0	0	0	I3	I3	I3	I3	0	III6	II3	0	0
Milchzucker-Agar	I3	I3	0	II3	0	II3	I3	III6	I3	0	I3	I3	0	0	0	0	I3	0	I3	I3	0	III3	II3	0	0
Leber-Agar	I3	I3	I3	I3	0	III6	I3	II6	I6	0	III6	III6	0	0	0	0	I6	I6	0	II6	0	0	0	0	0
Zeller-Agar	I3	I3	0	I3	0	II3	I3	0	I3	0	I3	I3	0	0	0	0	I3	0	I3	I3	0	III3	0	0	0

Tabelle 2b.

Alkohol	20 %				40 %				60 %				80 %			
Tag des Versuchsbeginns	15. 5	15. 5.	15. 5.	15. 5.	15. 5.	15. 5.	15. 5.	15. 5.	15. 5	15. 5.	15. 5.	15. 5.	15. 5.	15. 5.	15. 5.	15. 5.
Stunden Einwirkungszeit	0	1	2	4	0	1	2	4	0	1	2	4	0	1	2	4
Amnion-Agar	I3	III3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Drigalski-Agar	I3	II3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kalbfleisch-Agar	I3	I3	0	0	0	0	0	0	0	III6	0	0	0	0	0	0
Milchzucker-Agar	I3	I3	0	0	I3	0	0	0	II3	0	0	0	0	0	0	0
Leber-Agar	I3	I3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Zeller-Agar	I3	I3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	II3	0	0	0	0

0 und 1¾ Stunden auf sämtlichen Nährböden durchgehend noch ein sehr gutes und sehr rasches Wachstum erzielt wurde. Für den Hauptversuch wurde deshalb die Konzentration von 0,1% mit einer Einwirkungszeit von 1¾ Stunden gewählt.

Vorbehandlung mit Alkohol: Aus der Tabelle 2 b ist ersichtlich, daß nur bei einer Vorbehandlung mit einer Konzentration von 20% ohne Einwirkungszeit das Wachstum der Abortusbazillen auf sämtlichen Nährböden ein sehr gutes und sehr rasches war. Für den Hauptversuch wurde deshalb eine Konzentration von 20% ohne Einwirkungszeit gewählt.

Hauptversuch II.

Versuchsanordnung.

1. Versuchsbeginn: In der Tabelle II angeführt.

2. Untersuchungsmaterial: 6 Einzelfälle (1 Fetus, 3 Eihäute, 2 Uterussekrete).

3. Prüfung des Untersuchungsmaterials: Mit dem Material aus den Einzelfällen wurden je 3 bezw. 5 Meerschweinchen geimpft. Das Ergebnis des Impfversuches ist zum Teil (E. 92, U. 96, E. 96, E. 98) bereits in der Versuchsanordnung zum Hauptversuch I niedergelegt. Das Ergebnis des Impfversuches der beiden übrigen Einzelfälle (U. 100, F. 100) ist aus nachfolgender Tabelle ersichtlich.

Das Ergebnis war (serologisch oder kulturell) positiv bei 5 Einzelfällen (E. 92, U. 96, E. 98, F. 100, U. 100).

Mit Ausnahme des Falles F. 100, der nur in diesem Versuch Verwendung fand, sind sämtliche übrigen Einzelfälle auch in anderen Versuchen kulturell geprüft worden und zwar die Fälle E. 92, U. 96, E. 96 und E. 98 in Hauptversuch I, letztgenannter Fall auch noch in Hauptversuch III. In keinem der genannten Hauptversuche gelang der kulturelle Nachweis von Abortusbazillen. Der Fall U. 100 wurde im Hauptversuch III beigezogen; dabei wurden kulturell Abortusbazillen festgestellt.

Impfversuch zu Hauptversuch II.

Untersuchungsmaterial	Ms. No.	Tag der Impfung	Vorbehandlung des Materials	Serologische Prüfung			Gesamtergebnis
				am	Tage p. i.	Titer	
U. 100	89	11. 7.	—	12. 8.	32	600	serologisch positiv, kulturell nicht geprüft
	90	11. 7.	—	12. 8.	32	200	
	91	11. 7.	—	12. 8.	32	1000	
F. 100	92	11. 7.	—	12. 8.	32	100	serologisch positiv, kulturell nicht geprüft
	93	11. 7.	—	12. 8.	32	600	
	94	11. 7.	—	12. 8.	32	600	

4. Nährböden: Die gleichen wie in Vorversuch 2. Es wurden von jedem Nährboden 2 Platten angelegt.

5. Züchtungsmethoden: Leuchtgas, Luftverdünnung, Coli-Symbiose.

6. Sonstige Versuchsbedingungen: Das Untersuchungsmaterial wurde vor dem Anzüchten auf den Nährböden mit 0,1 prozentigem Antiformin auf die Dauer von 1¾ Std. bzw. mit 20 %igem Alkohol ohne Einwirkungszeit vorbehandelt.

Versuchsergebnis.

Das Versuchsergebnis ist in der Tabelle II niedergelegt.

Der Versuch hat folgendes ergeben:

Bewertung des Untersuchungsmaterials: In 4 von den 6 Einzelfällen war das Wachstum der Begleitbakterien ein derartig starkes, daß Feststellungen bezüglich des Wachstums von Abortusbazillen nicht möglich waren oder möglich gewesen wären (E. 96). Es hat also das Antiformin und der Alkohol in den gewählten Konzentrationen und Einwirkungszeiten das Wachstum der Begleitbakterien nicht zu beeinträchtigen vermocht.

Tabelle II.

Untersuchungsmaterial			E. 92		U 96		E. 96		E. 98		F. 100		U. 100	
Tag des Versuchsbeginns			12. 6.		22. 6.		23. 6.		8 7.		10. 7.		10. 7.	
Vorbehandl. d. Mat. mit			Ant.	Alk.	Ant.	Alk.	Ant.	Alk.	Ant.	Alk.	Ant.	Alk	Ant.	Alk.
Leucht-gas	Amnion-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	B_3	A_3	—
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	b_3
	Drigalski-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	?	?
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	?	?
	Kalbfleisch-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	B_3	0	A_3
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	b_3	c_6	c_3
	Milchzuck. Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	B_3	A_3	A_3	A_3
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	c_3	c_3	c_3
	Leber-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	?
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	c_3	?
	Zeller-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	A_3	A_3
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	c_3	b_3
Luft-verdün-nung	Amnion-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	?	?	—
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	b_3	a_3
	Drigalski-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	B_6	0	—
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	b_3	c_3	b_3
	Kalbfleisch-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	?	0
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	?	a_3
	Milchzuck.-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	?	?	?
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	?	a_3	b_3
	Leber-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	?	0
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	c_3	c_3
	Zeller-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	?
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	?
Coli-Sym-biose	Amnion-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	A_3	A_3	A_3
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	b_3	c_3	a_3
	Drigalski-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	B_3	?	A_3	A_3
		Bb	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	c_3	c_3
	Kalbfleisch-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	B_3	A_3	A_3	A_3
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	b_3	c_3
	Milchzuck.-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	A_3	A_3	A_3	A_3
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	c_3	a_3	c_3
	Leber-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	B_3	—	A_3	A_3
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	c_3	b_3
	Zeller-Agar	Ab	—	—	—	—	—	—	—	—	-	A_3	A_3	A_3
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	c_3	b_3
Ergebnis:			—	—	—	—	—	—	—	—	p	p	p	p
Ergebnis d. Impfversuchs:			p		p		—		p		p		p	
weitere kultu- i.Versuch			I		I		I		I, III				III	
relle Prüfungen: Ergebnis			n		n		n		n				p	

Nur in 2 Fällen (F. 100 und U. 100) — das sind 40% der im Impfversuch positiven Einzelfälle — konnte auf einer Reihe von Nährböden Wachstum festgestellt werden. Auch im Hinblick auf die Zahl der mit diesen Einzelfällen beimpften Kulturplatten im Vergleich zur Zahl der Platten mit Abortusbazillenbefunden ist das Ergebnis als ein schlechtes zu bezeichnen. Auf 72 mit den beiden Einzelfällen beimpften Platten ließen nur 31 ein Wachstum von Abortusbazillen erkennen, das sind 43% der Platten. Ein wesentlicher Unterschied ließ sich dabei zwischen der Einwirkung des Antiformins und des Alkohols nicht feststellen. Das mit Antiformin vorbehandelte Material lieferte auf 14 Platten, das mit Alkohol vorbehandelte auf 17 Platten Kolonien von Abortusbazillen. Auch bezüglich der Art des Wachstums bestehen keine weitgehenden Unterschiede. Wachstum A_3 wurde bei Antiformin auf 10 Kulturplatten, bei Alkohol auf 14 Platten, Wachstum B_3 auf 4 bezw. 2 Platten, Wachstum B_6 nur bei Alkohol auf einer Platte ermittelt. Auch der Vergleich der Platten, die nicht so stark von Begleitbakterien überwuchert worden sind, daß nicht ein allenfallsiges Wachstum von Abortusbazillen hätte nachgewiesen werden können, ergibt keine Anhaltspunkte für einen Unterschied in der Brauchbarkeit des Antiformins oder Alkohols. (Wachstum 0: bei Antiformin-Vorbehandlung = 4 Platten, bei Alkohol-Vorbehandlung = 2 Platten).

Bewertung der Züchtungsmethoden: Von den 31 auf Abortusbazillen positiven Kulturplatten entfallen auf das Leuchtgas 10, auf die Luftverdünnung 1 und auf die Coli-Symbiose 20.

Bewertung der Nährböden: Von den 31 positiven Kulturplatten wurden hergestellt mit Milchzucker-Agar 8, Kalbfleisch-Agar 6, Amnion-Agar und Zeller-Agar je 5, Drigalski-Agar 4, Leber-Agar 3.

Zusammenfassend kann festgestellt werden: Die Vorbehandlung mit den von mir gewählten Chemikalien (Alkohol und Antiformin) in den angegebenen Konzentrationen und

Einwirkungszeiten stellt kein geeignetes Mittel zur Unterstützung des kulturellen Nachweises der Abortusbazillen in Organmaterial dar. Unter 5 untersuchten Einzelfällen, in denen die Anwesenheit von Abortusbazillen durch den Impfversuch erwiesen ist, konnten nur 2 durch das kulturelle Verfahren festgestellt werden, also nur 40%. Auch dort, wo der Nachweis der Abortusbazillen gelungen ist, war das Ergebnis unbefriedigend, da nur auf 43% der angezüchteten Platten Wachstum eintrat.

III. Versuch.

Es galt festzustellen, wie sich das Wachstum der Abortusbazillen bezw. auch das der Begleitbakterien nach den Züchtungsverfahren von Haupt und von Huddleson gestaltet. Die beiden Nährböden enthielten Varianten, insoferne der Nährboden von Haupt mit verschiedenem pH-Gehalt und der Nährboden von Huddleson mit und ohne Farbzusatz hergestellt wurde. Es wurde nur mit Organmaterial gearbeitet.

Hauptversuch III.

Versuchsanordnung.

1. Versuchsbeginn: In der Tabelle III angeführt.

2. Untersuchungsmaterial: 6 Einzelfälle (3 Feten, 2 Eihäute, 1 Uterussekret).

3. Prüfung des Untersuchungsmaterials: Mit dem Material der 6 Einzelfälle wurden mit Ausnahme des Falles F. 99, der wegen starker Fäulnis ausschied, je 3 Meerschweinchen geimpft. Das Ergebnis der Impfversuche ist zum Teil (E. 98, U. 100) bereits in den Versuchsanordnungen zu Hauptversuch I und II niedergelegt. Das Ergebnis des Impfversuches der 3 übrigen Einzelfälle (F. 103, F. 106, E. 108) ist aus nachfolgender Tabelle ersichtlich.

Der Impfversuch war (serologisch) positiv bei den 5 Einzelfällen (E. 98, U. 100, F. 103, F. 106, E. 108).

Impfversuch zu Hauptversuch III.

Unter-chungs-naterial	Ms. No.	Tag der Im-pfung	Tag der Nach-impf.	Vor-behandlung des Materials mit	Verendet am	Verendet Tage p. i.	Serologische Prüfung am	Serologische Prüfung Tage p. i.	Serologische Prüfung Titer	Gesamt-ergebnis
103	96	17. 7.	—	—	—	—	17. 8.	31	400	serol. pos., kulturell nicht geprüft
	97	17. 7.	—	—	—	—	17. 8.	31	100	
	98	17. 7.	—	—	—	—	17. 8.	31	600	
106	99	21. 7.	—	—	—	—	21. 8.	31	10	serol. pos., kulturell nicht geprüft.
	100	21. 7.	—	—	—	—	21. 8.	31	<10	
	101	21. 7.	—	—	—	—	21. 8.	31	400	
108	102	24. 7.	—	—	25. 7.	1	—	—	—	serol. pos., kulturell nicht geprüft.
	103	24. 7.	—	—	25. 7.	1	—	—	—	
	104	24. 7.	—	—	25. 7.	1	—	—	—	
	105	—	25. 7.	Alkohol (20 %) ohne Einwirkungszeit	—	—	25. 8.	31	75	
	106	—	25. 7.		—	—	25. 8.	31	20	
	107	—	25. 7.		—	—	25. 8.	31	10	

Die Fälle E. 98 und U. 100 wurden auch in Hauptversuch II kulturell geprüft; ersterer war negativ, letzterer positiv; Die Fälle F. 103, F. 106 und E. 108 wurden auch in Hauptversuch IV kulturell geprüft; der Fall F. 103 war dabei positiv, die beiden andern negativ.

4. Nährböden: Haupt-Agar, Huddleson-Agar. Es wurden von jedem Nährboden 3 Platten angelegt.

5. Züchtungsmethoden: Bei Haupt-Agar technische Kohlensäure, bei Huddleson-Agar naszierende Kohlensäure.

6. Sonstige Versuchsbedingungen: Beim Hauptagar wurde der pH-Gehalt variiert (6,8 bezw. 7,4 pH), der Huddleson-Agar wurde mit und ohne Farbzusatz (Gentianaviolett 1:10000) verwendet. Die 3 Platten wurden nicht gleichmäßig mit dem Untersuchungsmaterial beimpft, sondern es wurde nach Ausstreichen des Materials auf der 1. Platte ohne weiteres mit

der gleichen Platinöse die zweite Platte beimpft und nach der zweiten Platte ebenso die dritte Platte. Damit wurde das Untersuchungsmaterial auf den Platten in fallenden Mengen ausgestrichen.

Versuchsergebnis.

Das Versuchsergebnis ist in der Tabelle III niedergelegt. Der Versuch hat folgendes ergeben:

Bewertung des Untersuchungsmaterials: Der Einzelfall F. 99, in dem die Anwesenheit von Abortusbazillen weder durch den Impfversuch noch durch den kulturellen Nachweis in anderen Versuchen erwiesen ist, läßt lediglich die Feststellung zu, daß mit den beiden Züchtungsverfahren das Wachstum der Begleitbakterien nicht zurückgedrängt wird.

Von den übrigen 5 Einzelfällen, in denen Abortusbazillen nach dem Ausfall des Impfversuches oder auch anderer Kulturversuche vorhanden waren, gelang nur bei einem Fall (U. 100) der kulturelle Nachweis der Abortusbazillen. Das Züchtungsergebnis ist demnach als ein schlechtes zu bezeichnen, da nur 20% der untersuchten positiven Fälle festgestellt wurden. In der Hauptsache wurde das Wachstum der Abortusbazillen durch das Überwuchern der Begleitbakterien verhindert. Das kulturelle Ergebnis im Einzelfalle U. 100 selbst ist ebenfalls als schlecht zu bezeichnen; unter 12 angezüchteten Platten zeigten nur 4, das sind 33% Wachstum von Abortusbazillen.

Bewertung der Züchtungsmethoden: Ein Unterschied in den gewählten Züchtungsmethoden kann nicht festgestellt werden; die 4 Fälle nachgewiesenen Wachstums von Abortusbazillen verteilen sich gleichmäßig auf die Methode von Haupt und von Huddleson.

Bewertung der Nährböden: Die 4 mit Abortusbazillen bewachsenen Kulturplatten des Einzelfalles U. 100 verteilen sich gleichmäßig auf die beiden Nährböden mit den beiden Variationen. Auf den 4 Kulturplatten war das Wachstum ein sehr gutes (A) und setzte rasch ein (jeweils am dritten Tag).

Tabelle III.

Untersuchungsmaterial				E. 98			F. 99			U. 100			F. 103			F. 106			E. 108		
Tage des Versuchsbeginnes				8. 7			9. 7.			11. 7.			16 7.			21. 7.			24. 7.		
Angezüchtete Platten				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Technische Kohlensäure	Haupt-Agar	pH : 6,8	Ab.	—	—	—	—	—	—	?	A_3	?	—	—	—	—	—	—	—	—	—
			Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	?	c_6	?	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3
		pH : 7,4	Ab.	—	—	—	—	—	—	0	?	A_3	—	0	0	—	—	—	—	—	—
			Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	?	0	a_3	c_3	c_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3
Ergebnis				—			—			p			—			—					
Naszierende Kohlensäure	Huddleson Agar	ohne Farbzusatz	Ab.	—	—	—	—	—	—	A_3	?	?	—	?	—	—	—	—	—	—	—
			Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	b_3	c_3	?	?	a_3	?	0	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3
		mit Farbzusatz	Ab.	—	—	0	—	—	—	A_3	?	?	—	—	0	—	—	—	—	—	—
			Bb.	a_3	b_3	c_3	a_3	a_3	b_3	0	?	?	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3
Ergebnis				—			—			p			—			—			—		
Ergebnis des Impfversuches				p			nicht verimpft			p			p			p			p		
Weitere kulturelle Prüfungen		In Versuch		II						II			IV			IV			IV		
		Ergebnis		n						p			p			n			n		

Die Variation in Überimpfung des gleichen Materials von der ersten Platte auf die zweite und von dieser auf eine dritte Platte hat sich nur wenig bewährt. Nur in einigen Fällen entwickelte sich auf der zweiten oder dritten Platte ein schwächeres Wachstum von Begleitbakterien als auf der ersten. Versager, so zwar, daß das Wachstum von Abortusbazillen hätte beobachtet werden können, wenn es eingetreten wäre, wurden auf insgesamt 8 Kulturplatten festgestellt und zwar auf 4 Platten der Methode von Haupt und auf 4 Platten der Methode von Huddleson.

Zusammenfaßend kann festgestellt werden, daß sich die Methode von Haupt, sowie die von Huddleson auch in den gewählten Variationen zum kulturellen Nachweis von Abortusbazillen in Organmaterial nur wenig eignet; das Wachstum der Begleitbakterien wird zu wenig zurückgehalten.

IV. Versuch

Es galt festzustellen, ob durch Zusatz von Farblösungen bzw. Karbolsäure bestimmter Konzentrationen zu den Nährböden das Wachstum der Begleitbakterien zurückgedrängt wird, ohne daß dabei das Wachstum der Abortusbazillen gestört wird.

In einem Vorversuch wurde der Einfluß der Farblösungen und der Karbolsäure in verschiedenen Konzentrationen und bei verschiedener Dauer der Einwirkungszeit auf die Abortusbazillen festgestellt, indem das vorbehandelte Kulturmaterial auf Kulturplatten verbracht wurde. Die in diesem Versuch als brauchbar ermittelten Konzentrationen der Farblösungen bezw. der Karbolsäure wurden weiterhin Nährböden unmittelbar zugesetzt und das Wachstum von Abortusbazillen auf den so vorbereiteten Nährböden geprüft. Auf den mit den gleichen Zusätzen versehenen Nährböden wurde auch Organmaterial angezüchtet.

Vorversuch 4a.

Versuchsanordnung.

1. Versuchsbeginn: Dahlia: 19., 28. Juni, 1., 4. Juli 1931. Gentianaviolett: 13., 26., 29. Juni, 2. Juli 1931. Kristallviolett: 17., 27., 30. Juni, 3. Juli 1931. Malachitgrün: 13., 25. Juni: 1., 4. Juli 1931. Karbolsäure: 17., 28. Juni, 1., 4. Juli 1931.

2. Untersuchungsmaterial: Kultur B. 7.

3. Prüfung des Untersuchungsmaterials: Die Prüfung im Impfversuch wurde bereits im Vorversuch 1 mit positivem serologischen Ergebnis durchgeführt.

4. Nährböden: Amnion-Agar, Drigalski-Agar, Kalbfleisch-Agar, Milchzucker-Agar, Leber-Agar, Zeller-Agar. Es wurde von jedem Nährboden eine Platte angelegt.

5. Züchtungsmethoden: Aerob.

6. Sonstige Versuchsbedingungen: Das Kulturmaterial wurde vor dem Auftragen auf die Kulturplatten mit 4 Farblösungen (Dahlia, Gentianaviolett, Kristallviolett, Malachitgrün) und Karbolsäure vorbehandelt; die Farblösungen wurden dabei in den Verdünnungen 1 : 5000, 1 : 10000, 1 : 20000, die Karbolsäure in den Verdünnungen 1 : 200, 1 : 400, 1 : 1000 angewendet. Die Einwirkungszeit auf das Kulturmaterial betrug jeweils 0 — 1 — 2 Stunden und weiterhin 3 — 6 — 9 Tage. Die tagelange Einwirkungszeit wurde unter dem Gesichtspunkt eingeschaltet, daß das Untersuchungsmaterial auf den Kulturplatten während einer Zeitdauer bis zu neun Tagen dem Einfluß der Zusätze ausgesetzt war. Außerdem wurde eine Kontrolle mit Kochsalzlösung bei einer Einwirkungsdauer von 2 Stunden angesetzt.

Versuchsergebnis.

Das Versuchsergebnis ist in der Tabelle 4 a niedergelegt. Der Versuch hat folgendes ergeben:

Tabelle 4 a.

Konzentration der Chemikalien		1 : 5000			1 : 10000			1 : 20000			1 : 5000			1 : 10000			1 : 20000		
Einwirkungsdauer		Stunden			Stunden			Stunden			Tage			Tage			Tage		
Stunden bezw. Tage		0	1	2	0	1	2	0	1	2	3	6	9	3	6	9	3	6	9
Tage des Versuchsbeginns		19. 6.	19. 6.	19. 6.	19. 6.	19. 6	19. 6.	19. 6.	19. 6.	19. 6.	28. 6.	1. 7.	4. 7.	28. 6.	1. 7.	4. 7.	28. 6.	1. 7.	4. 7.
Dahlia	Amnion-Agar	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	0	0	I_3	I_3	0	I_3	I_3	0
	Drigalski »	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	0	0	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3
	Kalbfleisch- »	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	III_3	0	I_3	I_3	0	I_3	I_3	III_3
	Milchzucker »	0	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	III_3	0	I_3	I_3	III_3	I_3	I_3	III_3
	Leber- »	III_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_6	0	0	I_6	0	0	I_6	I_6	0
	Zeller- »	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	0	0	I_3	I_3	0	I_3	I_3	0
Tage des Versuchsbeginns		13. 6	13. 6.	13. 6.	13. 6.	13. 6.	13 6	13. 6.	13. 6.	13. 6.	26. 6.	29. 6.	2. 7.	26. 6.	29. 6.	2. 7.	26. 6.	29. 6.	2. 7.
Gentiana-violett	Amnion-Agar	I_3	I_3	II_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	0	0	I_3	0	0	0	0	0
	Drigalski- »	I_3	I_3	III_3	III_3	III_3	I_3	III_3	I_3	III_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3
	Kalbfleisch- »	I_6	0	0	I_3	0	I_3	0	0	III_3	I_3	I_3	0	I_3	I_3	0	I_3	0	0
	Milchzucker»	I_3	I_3	I_3	I_3	III_3	0	III_3	III_3	I_3	I_3	I_3	0	I_3	I_3	0	I_3	I_3	0
	Leber- »	I_6	I_6	0	III_3	0	0	0	I_6	I_6	I_3	I_6	0	III_3	0	0	0	0	0
	Zeller- »	I_3	III_3	0	I_3	III_3	III_3	I_3	III_3	III_3	I_3	III_3	0	I_3	0	0	0	0	0
Tage des Versuchsbeginns		17. 6.	17. 6.	17. 6.	17. 6	17. 6.	17. 6.	17. 6.	17. 6.	17. 6.	27. 6.	30. 6.	3. 7.	27. 6.	30. 6.	3. 7.	27. 6.	30. 6.	3 7.
Kristall-violett	Amnion-Agar	I_3	I_3	I_3	III_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	0	0	I_3	I_3	0	I_3	I_3	0
	Drigalski- »	I_3	I_3	I_3	III_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	0	0	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3
	Kalbfleisch- »	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	0	0	I_3	I_3	0	I_3	I_3	0
	Milchzucker»	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	0	0	I_3	I_3	0	I_3	I_3	0
	Leber- »	0	0	I_3	I_3	III_3	I_3	I_3	III_6	I_3	0	0	0	I_6	III_6	0	I_6	III_3	0
	Zeller- »	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	III_3	I_3	I_3	0	0	I_3	I_3	0	I_3	I_3	0
Tage des Versuchsbeginns		13. 6	13. 6.	13. 6.	13. 6.	13. 6.	13 6.	13. 6.	13. 6.	13 6.	25. 6.	1. 7.	4. 7.	25. 6.	1. 7.	4. 7.	25. 6	1. 7.	4. 7.
Malachit-grün	Amnion-Agar	I_3	0	I_6	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I	I_3	0	0	I_3	I_3	0	I_3	I_3	0
	Drigalski- »	I_3	I_3	I_3	III_3	III_3	I_3	III_3	I_3	III_3	I_3	0	0	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3
	Kalbfleisch- »	I_3	I_3	I_6	I_3	III_3	III_3	0	0	0	I_3	0	0	I_3	I_3	0	I_3	I_3	0
	Milchzucker»	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	III_3	III_3	I_3	0	0	0	I_3	0	I_3	I_3	0
	Leber- »	I_3	I_6	0	III_3	I_6	I_6	0	I_6	I_6	0	0	0	0	0	0	I_3	I_6	0
	Zeller- »	III_3	I_3	I_3	0	I_3	I_3	I_3	I_3	III_6	I_3	0	0	I_3	I_3	0	I_3	I_3	0
Konzentration:		1 : 200			1 : 400			1 : 1000			1 : 200			1 : 400			1 : 1000		
Tage des Versuchsbeginns		17. 6.	17. 6	17 6	17. 6.	17. 6.	17. 6	17. 6.	17 6	17 6.	28 6.	1. 7.	4 7	28. 6.	1. 7.	4. 7	28 6	1. 7.	4. 7.
Karbol-säure	Amnion-Agar	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	II_3	I_3	I_3	0	0	0	III_9	0	0	I_3	I_3	0
	Drigalski »	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	II_3	I_3	0	0	0	III_9	0	0	I_3	0	I_3
	Kalbfleisch- »	0	III_6	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	0	0	0	III_3	0	0	I_3	0	0
	Milchzucker»	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	0	0	0	III_3	0	0	I_3	0	0
	Leber- »	II_3	0	II_6	I_3	0	I_3	I_3	II_3	I_3	0	0	0	0	0	0	I_6	0	0
	Zeller- »	II_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	I_3	0	0	0	III_3	0	0	I_3	0	0

Die Wirkung der Dahlia- und Gentianaviolettlösungen während einer 3 bis 9tägigen Beobachtungsdauer, ist, abgesehen von kleinen Schwankungen, in den einzelnen Konzentrationen ziemlich gleich. Desgleichen decken sich die Ergebnisse bei Vorbehandlung des Kulturmaterials mit Kristallviolett und Malachitgrün ziemlich weitgehend. Die Wahl der Farbmengen, die als Zusatz zu den Nährböden dienen sollten, wurde deshalb so getroffen, daß von den zwei Gruppen je ein Farbstoff in stärkster und einer in schwächster Konzentration zur Verwendung kam. Die Karbolsäure wirkte am günstigsten in der Konzentration 1 : 1000, insoferne die mit dieser Konzentration vorbehandelten Abortusbazillen wenigstens nach 3 tägiger Beobachtungsdauer noch keine Schädigung ihres Wachstums erkennen ließen.

Es wurde also für die weiteren Versuche den Nährböden zugesetzt: Dahlia in der Konzentration 1 : 20000, Gentianaviolett 1 : 5000, Kristallviolett 1 : 20000, Malachitgrün 1 : 5000 und Karbolsäure 1 : 1000.

Das mit Kochzalzlösung als Kontrolle vorbehandelte Material zeigte auf sämtlichen Nährböden ein sehr gutes und rasches Wachstum (I_3).

Vorversuch 4b.

Versuchsanordnung.

1. Versuchsbeginn: 21. Juli 1931.
2. Untersuchungsmaterial: Kultur B. 7.
3. Prüfung des Untersuchungsmaterials: Die Prüfung im Impfversuch wurde bereits im Vorversuch 1 mit positivem Ergebnis durchgeführt.
4. Nährböden: Amnion-Agar, Drigalski-Agar, Kalbfleisch-Agar, Milchzucker-Agar, Leber-Agar, Zeller-Agar. Es wurde von jedem Nährboden 1 Platte angelegt.
5. Züchtungsmethoden: Aerob.
6. Sonstige Versuchsbedingungen: Die Nährböden wurden

mit den im Versuch 4 a ausgewerteten Farblösungen bezw. mit Karbolsäure versetzt und zwar mit Dahlia und Kristallviolett in der Konzentration 1 : 20000, mit Gentianaviolett und Malachitgrün in der Konzentration 1 : 5000, mit Karbolsäure in der Konzentration 1 : 1000.

Versuchsergebnis.

Das Versuchsergebnis ist in der Tabelle 4 b niedergelegt.

Tabelle 4 b.

Zusätze zu den Nährböden	Dahlia 1 : 20000	Gentianaviolett 1 : 5000	Kristallviolett 1 : 20000	Malachitgrün 1 : 5000	Karbolsäure 1 : 1000
Tag des Versuchsbeginns	21. 7.				
Amnion-Agar	II_3	III_3	0	III_3	II_3
Drigalski-Agar	0	0	II_3	I_6	0
Kalbfleisch-Agar	II_3	III_6	II_3	III_3	0
Milchzucker-Agar	I_6	0	0	II_3	II_3
Leber-Agar	I_3	II_3	II_3	III_6	II_6
Zeller-Agar	I_3	0	0	III_3	II_6

Der Versuch hat folgendes ergeben:

Wird die Zahl der Kulturplatten, ausgeschieden nach den einzelnen Wachstumsgraden, zur Beurteilung beigezogen, so ergibt sich wie aus nachfolgender Übersicht hervorgeht, folgendes:

Zusätze	I	II	III	Sa.	0
Dahlia 1 : 20000	3	2	0	5	1
Gentianaviolett 1 : 5000	0	1	2	3	3
Kristallviolett 1 : 20000	0	2	1	3	3
Malachitgrün 1 : 5000	1	1	4	6	0
Karbolsäure 1 : 1000	0	4	0	4	2

Ein gutes Ergebnis (seltenes Versagen des Wachstums bezw. sehr gutes und gutes Wachstum) lieferten die Nährböden mit Zusatz von Dahlia (1 : 20000) und mit Malachitgrün (1 : 5000); ein mittleres Ergebnis lieferte die Karbolsäure (1 : 1000), am wenigsten befriedigend war das Ergebnis bei Gentianaviolett (1 : 5000) und Kristallviolett (1 : 20000).

Hauptversuch IV.

Versuchsanordnung.

1. Versuchsbeginn: In der Tabelle IV angeführt.

2. Untersuchungsmaterial: 3 Einzelfälle (2 Feten, 1 Eihaut).

3. Prüfung des Untersuchungsmaterials: Mit dem Material aus den 3 Einzelfällen wurden je 3 Meerschweinchen geimpft. Das Ergebnis des Impfversuches ist bereits in der Versuchsanordnung zu Hauptversuch III niedergelegt.

Das Ergebnis des Impfversuches war für sämtliche 3 Einzelfälle (F. 103, F. 106, E. 108) positiv.

Die 3 Einzelfälle wurden auch in dem Hauptversuch III beigezogen; das kulturelle Ergebnis war in den drei Fällen negativ.

4. Nährböden: Die gleichen wie im Vorversuch 4 b.

5. Züchtungsmethoden: Leuchtgas, Luftverdünnung und Coli-Symbiose.

6. Sonstige Versuchsbedingungen: Den Nährböden wurden die Farblösungen sowie Karbolsäure in den gleichen Konzentrationen zugesetzt wie in Vorversuch 4 b.

Versuchsergebnis.

Das Versuchsergebnis ist in der Tabelle IV niedergelegt. Der Versuch hat folgendes ergeben:

Bewertung des Untersuchungsmaterials: Von den 3 nach dem Impfversuch positiven Einzelfällen zeitigte im Kulturversuch nur der Einzelfall F. 103 ein positives Ergebnis. Bei den Einzelfällen F. 106 u. E. 108 konnte ein allenfallsiges Wachstum von Abortusbazillen wegen Überwucherns der Begleitbakterien auf den meisten Kulturplatten nicht festgestellt werden.

Bewertung der Zusätze zu den Nährböden: Das Wachstum von Abortusbazillen im Einzelfalle F. 103 wurde nur auf 3 Kulturplatten festgestellt. Es handelte sich dabei um Nährböden mit Zusatz von Dahlia (1 : 20000) — 2 Kulturplatten — und von Kristallviolett (1 : 20000) — 1 Kulturplatte. Auf den mit Gentianaviolett, Malachitgrün und Karbolsäure versetzten Platten versagte das Wachstum der Abortusbazillen. Von 270 im Gesamtversuch angezüchteten Platten waren 70 Versager; (Fehlen des Wachstums von Abortusbazillen, obgleich das Verhalten der Begleitbakterien das Wachstum zugelassen hätten). Sie verteilen sich auf die Nährbodenzusätze folgendermaßen: Malachitgrün 20, Gentianaviolett 19, Karbolsäure 12, Kristallviolett 10, Dahlia 9. Das Wachstum der Abortusbazillen war sehr gut, aber auffallend langsam (einmal am sechsten, zweimal am neunten Tag).

Bewertung der Züchtungsmethoden: Die 3 positiven Kulturplatten treffen auf die Züchtungsmethode durch Coli-Symbiose.

Bewertung der Nährböden: Die 3 positiven Platten verteilen sich auf Drigalski-Agar mit 2, Milchzucker-Agar mit 1 Kulturplatte; die 70 Versager auf Drigalski-Agar mit 16, Amnion- und Leber-Agar mit je 14, Kalbfleisch- und Milchzucker-Agar mit je 9, Zeller-Agar mit 8 Kulturplatten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Zusätze von Farblösungen bezw. Karbolsäure zu den Nährböden

Tabelle IV.

Zusätze zu d. Nährböden:			Dahlia 1 : 20000			Gentiana-violett 1 : 5000			Kristall-violett 1 : 20000			Malachit-grün 1 : 5000			Karbol-säure 1 : 1000		
Untersuchungsmaterial:			F 103	F. 106	E. 108	F 103	F 106	E. 108	F 103	F. 106	E. 108	F. 103	F. 106	E 108	F 103	F. 106	E 108
Tage des Versuchsbeginns:			17. 7.	21. 7.	24 7	17 7.	21. 7	24. 7	17. 7.	21 7	24. 7.	17 7.	21 7.	24 7	17. 7.	21 7.	24 7
Leuchtgas	Amnion-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	0	—	—	0	—	—	0	—	—
		Bb	b_3	a_3	a_3	b_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	0	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3
	Drigalski-Agar	Ab.	0	—	—	0	0	—	—	—	—	0	—	—	0	0	—
		Bb.	c_3	a_3	a_3	c_3	b_3	a_3	a_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	c_3	c_3	a_3
	Kalbfleisch-Agar	Ab.	0	—	—	0	—	—	—	—	—	0	—	—	0	—	—
		Bb.	c_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	0	a_3	a_9	c_3	a_3	a_3
	Milchzuck. Agar	Ab.	0	—	—	0	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—
		Bb.	a_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	b_3	a_3	a_3	b_3	a_3	a_3
	Leber-Agar	Ab.	0	—	—	0	—	—	0	—	—	0	0	—	0	—	—
		Bb.	a_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	0	c_3	b_3	c_3	a_3	a_3
	Zeller-Agar	Ab.	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		Bb	b_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3
Luftverdünnung	Amnion-Agar	Ab.	0	—	—	0	0	—	0	—	—	0	0	—	—	—	—
		Bb.	b_3	a_3	a_3	b_3	b_3	a_3	c_3	a_3	a_3	c_3	b_3	a_3	a_3	a_3	a_3
	Drigalski-Agar	Ab.	—	—	—	0	—	—	0	—	—	0	—	—	0	0	—
		Bb.	a_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	0	0	a_3
	Kalbfleisch-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	0	—	—	0	—	—	—	—	—
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	b_3	a_3	a_3	b_6	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3
	Milchzuck.-Agar	Ab.	—	—	—	0	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—	—
		Bb.	a_3	a_3	a_3	b_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3
	Leber-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	—	—	—	—
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	c_3	b_3	a_3	a_3	a_3	a_3
	Zeller-Agar	Ab.	—	—	—	0	0	—	0	—	—	0	—	—	?	—	—
		Bb.	a_3	a_3	a_3	b_3	b_3	a_3	b_3	a_3	a_3	b_3	a_3	a_3	b_3	a_3	a_3
Coli-Symbiose	Amnion-Agar	Ab.	0	—	—	0	—	—	0	—	—	0	—	—	0	—	—
		Bb.	b_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	c_6	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3
	Drigalski-Agar	Ab.	A_9	-	—	0	—	—	A_9	—	—	0	0	—	0	0	—
		Bb.	c_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	0	b_3	a_3	c_3	0	a_3
	Kalbfleisch-Agar	Ab.	0	—	—	0	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—
		Bb.	c_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	0	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3
	Milchzuck.-Agar	Ab.	A_6	—	—	0	0	—	—	—	—	0		—	0	—	—
		Bb.	b_3	a_3	a_3	b_3	b_3	a_3	a_3	a_3	a_3	c_6	a_3	a_3	b_3	a_3	a_3
	Leber-Agar	Ab.	0	—	—	0	0	—	0	—	—	0	-	—	0	—	—
		Bb.	b_3	a_3	a_3	b_3	b_3	a_3	b_3	a_3	a_3	0	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3
	Zeller-Agar	Ab.	?	—	—	0	—	—	0	—	—	0	—	—		—	
		Bb.	a_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	b_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3
Ergebnis:			p	—	—	0	—	—	p	—	—	0	-	—	0	-	—
Ergebnis d. Impfversuchs:			p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p
weitere kulturelle Prüfungen:	i. Versuch		III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III
	Ergebnis		n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n

das Wachstum der Begleitbakterien nicht wesentlich zu beeinträchtigen vermögen.

V. Versuch.

Es galt festzustellen, ob sich die Züchtungsergebnisse verbessern ließen, wenn die Nährböden, wie sie im Hauptversuch IV Verwendung fanden, mit anderen Züchtungsmethoden kombiniert werden. Es wurden deshalb die Nährböden wie im Hauptversuch IV, aber die Züchtungsmethoden nach dem Verfahren von Haupt und Huddleson gewählt.

Hauptversuch V.

Versuchsanordnung.

1. Versuchsbeginn: In der Tabelle V angeführt.
2. Untersuchungsmaterial: 3 Einzelfälle (3 Eihäute).
3. Prüfung des Untersuchungsmaterials: Mit dem Material aus den 3 Einzelfällen wurden je 3 Meerschweinchen geimpft. Das Ergebnis des Impfversuches ist in der nachfolgenden Tabelle niedergelegt.

Das serologische Ergebnis war für sämtliche 3 Einzelfälle positiv.

Die 3 Einzelfälle wurden in anderen Hauptversuchen kulturell nicht geprüft.

4. Nährböden: Amnion-Agar, Drigalski-Agar, Kalbfleisch-Agar, Milchzucker-Agar, Leber-Agar, Zeller-Agar. Es wurde von jedem Nährboden 1 Platte angelegt.
5. Züchtungsmethoden: Technische Kohlensäure und nascierende Kohlensäure.
6. Sonstige Versuchsbedingungen: Die Nährböden wurden wie in Hauptversuch IV mit Dahlia und Kristallviolett in der Konzentration 1:20000, mit Gentianaviolett und Malachitgrün in der Konzentration 1:5000, mit Karbolsäure in der Konzentration 1:1000 versetzt.

Impfversuch zu Hauptversuch V.

Unter-suchungs-material	No. Ms.	Tag der Impfung	Tag der Nachimpf.	Vorbehandlung des Materials mit	Verendet am	Verendet Tage p. i.	Serologische Prüfung am	Serologische Prüfung Tage p. i.	Serologische Prüfung Titer	Gesamtergebnis
. 110	108	29. 7.	—	—	—	—	29. 8.	31	400	serol.pos., kulturell nicht geprüft.
	109	29. 7.	—	—	—	—	29. 8.	31	75	
	110	29. 7.	—	—	—	—	29. 8.	31	200	
. 114	111	29. 7.	—	Alkohol (20 %) ohne Einwirkungszeit	—	—	29. 8.	31	400	serol.pos , kulturell nicht geprüft.
	112	29. 7.	—		9. 8.	11	—	—	—	
	113	29. 7.	—		8. 8.	10	—	—	—	
. 115	114	1. 8.	—	—	3. 8.	2	—	—	—	serol.pos., kulturell nicht geprüft.
	115	1. 8.	—	—	3. 8.	2	—	—	—	
	116	1. 8.	—	—	3. 8.	2	—	—	—	
	117	—	3. 8.	Alkohol (20 %) ohne Einwirkungszeit	—	—	3. 9.	30	200	
	118	—	3. 8.		—	—	3. 9.	30	100	
	119	—	3. 8.		—	—	3. 9.	30	40	

Versuchsergebnis.

Das Versuchsergebnis ist in der Tabelle V niedergelegt. Der Versuch hat folgendes ergeben:

Bewertung des Untersuchungsmaterials: Von den nach dem Impfversuch positiven 3 Einzelfällen lieferten 2 (E. 114, E. 115) kulturell positive Ergebnisse. Bei dem Einzelfall E. 110 waren sämtliche Kulturplatten mit Begleitbakterien überwuchert.

Bewertung der Zusätze zu den Nährböden: Insgesamt waren mit den beiden kulturell positiven Einzelfällen 120 Kulturplatten beimpft worden. Nur auf 16 Kulturplatten wurde Wachstum von Abortusbazillen festgestellt; davon treffen, nach den Zusätzen ausgeschieden, auf Karbolsäure 7, Malachitgrün 6, Kristallviolett 2, und Gentianaviolett 1 Kulturplatte. Das Wachstum war ein sehr gutes nur auf den mit Karbolsäure

Tabelle V.

Zusätze zu d. Nährböden:			Dahlia 1:20000			Gentiana-violett 1:5000			Kristall-violett 1:20000			Malachit-grün 1:5000			Karbol-säure 1:1000		
Untersuchungsmaterial:			E 110	E. 114	E. 115	F 110	E 114	E. 115	E. 110	E. 114	E. 115	E. 110	E. 114	E 115	E 110	E 114	E 115
Tage des Versuchsbeginns:			28 7.	28. 7.	31 7	28 7.	28. 7	31. 7	28 7.	28 7	31 7.	28 7.	28 7.	31. 7	28. 7	28 7.	31 7
Tech-nische Kohlen-säure	Amnion-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	B_3	—	—	A_3
		Bb	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	0
	Drigalski-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	B_3	—	—	—	—	—	A_3
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	0
	Kalbfleisch-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	B_3	—	—	—
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3
	Milchzuck. Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3
	Leber-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	C_3	—	—	—
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	b_3	c_3	b_3	a_3	a_3	a_3
	Zeller-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	A_3
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	0
Naszie-rende Kohlen-säure	Amnion-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	B_3	—	—	C_3	—	—	A_3
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	0
	Drigalski-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	B_3	—	—	A_3
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	0
	Kalbfleisch-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	B_3	—	—	A_3
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	c_3	a_3	a_3	0
	Milchzuck.-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	b_3	a_3	a_3	a_3
	Leber-Agar	Ab.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	b_3	b_3	b_3	a_3	a_3	a_3
	Zeller-Agar	Ab.	—	—	—	—	B_6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	A_3
		Bb.	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	a_3	b_3	a_3	a_3	0
Ergebnis:			—	—	—	—	p	—	—	—	p	—	—	p	—	—	p
Ergebnis des Impfversuchs:			p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p

Weitere kulturelle Prüfungen: In anderen Hauptversuchen nicht geprüft.

versetzten Kulturplatten, gut auf den mit Kristallviolett und mit Gentianaviolett sowie auf 4 mit Malachitgrün versetzten Platten, schlecht auf 2 mit Malachitgrün versetzten Kulturplatten. Das Wachstum erfolgte auf 15 Kulturplatten sehr rasch und nur auf 1, mit Gentianaviolett versetzten Kulturplatte erst nach 6 Tagen. Danach scheint der Karbolsäurezusatz den meisten Erfolg zu versprechen.

Bewertung der Züchtungsmethoden: Es treffen auf naszierende Kohlensäure 9, auf technische Kohlensäure 7 positive Platten.

Bewertung der Nährböden: Die 16 positiven Kulturplatten verteilen sich folgendermaßen: Amnion-Agar 5, Drigalski-Agar 4, Kalbfleisch- und Zeller-Agar je 3, Leber-Agar 1, Milchzucker-Agar 0.

Zusammenfaßend kann festgestellt werden, daß auch mit Änderung der Züchtungsmethoden auf den mit Farblösungen bzw. mit Karbolsäure versetzten Nährböden das Ergebnis des Kulturversuches unbefriedigend war.

Zusammenfassung.

Meine Versuche haben zu keinem abschließenden Ergebnis geführt; es ist nicht gelungen ein Züchtungsverfahren zu ermitteln, mit dem der Nachweis von Abortusbazillen in Organmaterial sicher geführt werden kann.

Das Untersuchungsmaterial bestand in meinen Versuchen aus 4 Laboratoriumskulturen und 39 Einzelfällen; letztere umfaßten Material von 10 Feten, 9 Eihäuten, 2 Uterussekreten und 18 Milzen infizierter Meerschweinchen.

Im Impfversuch wurden auf die Anwesenheit von Abortusbazillen geprüft außer den Laboratoriumskulturen 38 Einzelfälle, also sämtliche Einzelfälle von Organmaterial mit Ausnahme eines Falles. In 29 Einzelfällen war das Ergebnis des Impfversuches positiv (6 Feten, 8 Eihäute, 2 Uterussekrete, 13

Milzen); in 9 Einzelfällen bezw., unter Einschluß des im Impfversuch nicht geprüften Einzelfalles, in 10 Einzelfällen wurde also kein positives Impfergebnis ermittelt.

Das Organmaterial wurde in insgesamt 5 Kulturversuchen geprüft; 31 Einzelfälle unterstanden dabei der Prüfung in nur je einem Versuch, darunter befinden sich die 18 Meerschweinchen-Milzen, 7 Einzelfälle unterstanden der Prüfung in je 2 Versuchen, 1 Einzelfall in je 3 Versuchen. Soweit Einzelfälle in mehreren Versuchen geprüft wurden, war das Ergebnis dieser Prüfung ein Übereinstimmendes, abgesehen von einem Fall (F. 103) — Hauptversuch III und IV —, der in einem Versuch ein negatives, im anderen ein positives Ergebnis zeitigte.

Von den 29, nach dem Impfversuch positiven Einzelfällen lieferten nur 13 (= 45% der Einzelfälle) in einem oder mehreren Kulturversuchen Wachstum von Abortusbazillen. In den 10 Einzelfällen, in denen die Prüfung im Impfversuch das Vorliegen von Abortusbazillen nicht erwies, bezw. in denen die Prüfung des Untersuchungsmaterials unterlassen wurde, lieferte keiner im Kulturversuch einen Befund von Abortusbazillen.

Das Ergebnis der Kulturversuche war in der Hauptsache abhängig von der Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials, das heißt von der stärkeren oder geringeren Anwesenheit von Begleitbakterien und von deren Art. Bei Fortsetzung der von mir begonnenen Versuche müßte deshalb darauf geachtet werden, zur Prüfung der einzelnen Züchtungsverfahren auf ihre Brauchbarkeit jeweils eine nicht zu gering bemessene Anzahl von Einzelfällen beizuziehen. Andernfalls wären Täuschungen und Trugschlüsse bei der Beurteilung der Züchtungsverfahren nicht vermeidbar.

In den Versuchen wurden insgesamt 3436 Kulturplatten verarbeitet. Den nachfolgenden Berechnungen kann indessen nur die Zahl von 2244 Kulturplatten zu Grunde gelegt werden. Soweit nämlich in einzelnen Versuchen mehrere gleichartige

Platten zur Verwendung kamen, sollen diese nur als eine Kulturplatte gerechnet werden, um eine gleichheitliche Vergleichsbasis zwischen den einzelnen Versuchen zu schaffen. Unter diesem Gesichtspunkte ist ja auch die Beurteilung der Versuchsergebnisse in den einzelnen Versuchen durchgeführt worden. Es blieb auch die Zahl der Kulturplatten unberücksichtigt, auf denen ein Wachstum von Abortusbazillen nicht zu erwarten war, da diese Erreger durch die Vorbehandlung des Materials vernichtet worden waren; es handelt sich um die Kulturplatten, die im Vorversuch 2 mit Untersuchungsmaterial beimpft wurden, das mit höheren Konzentrationen von Antiformin und Alkohol bezw. mit Salzsäure vorbehandelt worden war.

Bei den nachfolgenden Gegenüberstellungen wird indessen keine Rücksicht darauf genommen werden, ob die Kulturplatten mit Einzelfällen beimpft worden waren, die nach dem Ausfall des Impfversuches als positiv anzusprechen waren oder nicht. Das zahlenmäßige Vergleichsmaterial erleidet dadurch keine fehlerhafte Verschiebung, weil ganz allgemein in sämtlichen Versuchen die Berechnung auf dieser gleichen Grundlage erfolgt.

Von den 2244 Kulturplatten wurden 894 mit Kulturmaterial, 1350 mit Organmaterial beschickt.

Zur Auswertung der Züchtungsmethoden sollen diese Gruppen auseinander gehalten werden. Von den 894 mit Kulturmaterial beschickten Platten lieferten 574 ein für Abortusbazillen positives Ergebnis. Nach dem prozentualen Anteil beteiligen sich die positiven Kulturplatten in den einzelnen Züchtungsmethoden wie folgt: Luftverdünnung 79%, Coli-Symbiose 71%, aerobe Züchtung 64%, Leuchtgas 58%. Von den 1350 mit Organmaterial beimpften Platten lieferten 95 ein für Abortusbazillen positives Ergebnis, hier stellt sich der prozentuale positive Anteil in den einzelnen Züchtungsmethoden folgendermaßen: Coli-Symbiose 11%, Leuchtgas 8%, naszierende Kohlensäure 7%, technische Kohlensäure

6 %, Luftverdünnung 3 %. Es muß indessen berücksichtigt werden, daß hier das Ergebnis bei den Züchtungsmethoden mit technischer und naszierender Kohlensäure stark beeinflußt wird durch die Beiziehung der Nährböden nach Haupt und nach Huddleson zu den Versuchen. Läßt man die Ergebnisse auf diesen beiden Nährböden (also Hauptversuch III) außer Berechnung, vergleicht man also die Ergebnisse zwischen den einzelnen Züchtungsmethoden nur insoweit die Züchtung auf den übrigen Nährböden (Amnion-Agar, Drigalski-Agar, Kalbfleisch-Agar, Milchzucker-Agar, Leber-Agar, Zeller-Agar) stattgefunden hat, so verschiebt sich die Reihe folgendermaßen: Coli-Symbiose 11 %, naszierende Kohlensäure 10 %, Leuchtgas und technische Kohlensäure je 8 %, Luftverdünnung 3 %. Es erscheint vor allem auffällig, daß die Züchtungsmethode mit Luftverdünnung in den Versuchen mit Kulturmaterial an erster Stelle steht, in den Versuchen mit Organmaterial aber an letzter Stelle.

Ich möchte mich mit dieser vergleichenden Aufzählung begnügen, ohne daraus weitgehende Schlüsse für die Bewertung der einzelnen Züchtungsmethoden zu ziehen. Dazu erscheinen mir die zahlenmäßigen Unterlagen hinsichtlich der positiven Kulturplatten zu gering.

Von den 2244 Kulturplatten wurden hergestellt je 350 mit Amnionagar, Drigalskiagar, Kalbfleischagar, Milchzuckeragar, Leberagar, Zellergar, und je 72 mit Nährböden nach Haupt und nach Huddleson. Nachdem die ersten 6 Nährböden in gleicher Anzahl beimpft wurden, erübrigt sich die Errechnung von Prozentzahlen hinsichtlich der Platten, auf denen Abortusbazillen festgestellt wurden. Um die größere oder geringere Brauchbarkeit vergleichsweise zu ermitteln, genügt die Gegenüberstellung der absoluten Zahlen der positiven Kulturplatten. Danach ergibt sich folgende Reihe: Drigalskiagar mit 126, Kalbfleisch-Agar mit 116, Amnion-Agar mit 105, Milchzuckeragar mit 115, Zelleragar mit 112, Leberagar mit 91 kulturell positiven Kulturplatten. Danach hat sich der Drigalski-Agar am besten, der Leber-Agar am wenig-

sten bewährt; die übrigen 4 Nährböden zeigen hinsichtlich ihrer Brauchbarkeit zur Züchtung der Abortusbazillen untereinander keine sehr weitgehenden Abweichungen. Die Züchtungsergebnisse auf den Nährböden nach Haupt und nach Huddleson waren im Vergleich hierzu viel weniger befriedigend: Von je 72 Kulturplatten eines jeden Nährbodens zeigten nur je 2 Wachstum von Abortusbazillen. Im Hinblick auf das verhältnismäßig nur geringe Vergleichsmaterial möchten indessen bezüglich dieser beiden Nährböden keine zu weitgehenden Schlüsse gezogen werden.

Auch die von mir beigezogenen sonstigen Versuchsbedingungen, sei es in Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials oder in Zusätzen zu den Nährböden, zeitigten keine befriedigenden Ergebnisse. Auch hier berechtigt das verhältnismäßig geringe positive Beobachtungsmaterial nicht, irgendwelche bindenden Schlußfolgerungen zu ziehen. Soweit auf diesen Versuchen weitergebaut werden kann, dürfte es sich empfehlen, die Konzentrationen der verwendeten Flüssigkeiten zu erhöhen bezw. bei Vorbehandlung des Materials die Einwirkungszeit zu verlängern.

Zweifellos liegt die praktische Lösung der Frage, wie der kulturelle Nachweis der Abortusbazillen in Organmaterial gesichert werden kann, in der Ermittlung eines Züchtungsverfahrens, das an erster Stelle das Wachstum der Begleitbakterien zurückdämmt, dabei aber nicht die Abortusbazillen in ihrem Wachstum zu stark schädigt.

Es dürfte sich empfehlen auch die Ergebnisse der Impfversuche, wenn diese auch nur nebenbei zur Prüfung des Untersuchungsmaterials durchgeführt wurden, zusammenzufassen und zu würdigen. Es wurden insgesamt 118 Meerschweinchen mit Untersuchungsmaterial geimpft; unter diesen befinden sich auch die 18 Meerschweinchen, die nach Infektion mit Kulturmaterial bezw. mit Organmaterial getötet wurden und deren Milzen in Hauptversuch I der kulturellen Prüfung unterstellt wurden. In dem Zeitraum vom 1. bis 49. Tage nach

der Infektion sind insgesamt 48 Meerschweinchen (= 41% der geimpften Tiere) eingegangen. Der Verlust an Impftieren ist demnach als sehr hoch zu bezeichnen. Es verendeten innerhalb 2 Tagen nach der Impfung 28 Meerschweinchen (= 58% der Verluste), zwischen 3-13 Tagen nach der Impfung 8 Meerschweinchen (= 17% der Verluste) und zwischen 15 und 49 Tagen nach der Impfung 12 (= 25% der Verluste). Die Mehrzahl der Todesfälle trat also schon innerhalb zweimal 24 Stunden nach der Impfung ein, fast ausnahmslos bedingt durch Infektion mit Begleitbakterien des Untersuchungsmaterials. Bei den später verendeten Meerschweinchen wurden in einzelnen Fällen auch andere Krankheiten festgestellt z. B. Pseudotuberkulose, bezüglich deren nicht feststeht, ob sie mit dem Ausgangsmaterial in ursächlichem Zusammenhang standen.

Der serologischen Prüfung auf die stattgehabte Infektion wurden insgesamt 70 Meerschweinchen zugeführt, von diesen reagierten 61 positiv und 7 negativ; 2 lieferten ein fragliches Ergebnis. Die serologische Prüfung fand in verschiedenen zeitlichen Abständen statt, nämlich 14 bis 102 Tage nach der Impfung.

Zur Feststellung, welche Sicherheit der Impfversuch zum Nachweis der Abortusbazillen bietet, eignen sich nur die Einzelfälle, in denen mehrere Meerschweinchen geimpft und der serologischen Prüfung zugeführt wurden. Für die nachfolgende Betrachtung scheiden also die Meerschweinchen aus, deren Milzen dem Kulturversuch zugeführt wurden, weil eine Weiterverimpfung von Milzmaterial auf andere Meerschweinchen unterblieb. Es stehen damit nur die zwanzig Einzelfälle (Feten, Eihäute, Uterussekrete) zur Erörterung, die jeweils an mehrere Meerschweinchen verimpft worden waren. In 15 Einzelfällen war das serologische Ergebnis übereinstimmend positiv bei sämtlichen, mit dem Material eines Einzelfalles geimpften Meerschweinchen; in 1 Einzelfall war das Ergebnis übereinstimmend negativ; 3 Einzelfälle blieben ungeklärt, weil eine serologische Untersuchung der Impftiere nicht statt-

gefunden hat; nur in 1 Einzelfalle stimmte das Ergebnis zwischen den Impftieren nicht überein, insoferne von 3 serologisch geprüften Impftieren 2 ein positives und 1 ein negatives Ergebnis lieferte. Die serologische Prüfung der Meerschweinchen ist demnach als ziemlich sicher zu bezeichnen, da nur 1 Fall (= 5 %) der Einzelfälle) das Ergebnis des Impfversuches zwischen den einzelnen Tieren nicht übereingestimmt hat.

Der kulturellen Prüfung auf die Anwesenheit von Abortusbazillen in der Milz wurden 18 infizierte Meerschweinchen unterzogen; das Ergebnis des Kulturversuches, auch im Vergleich zu dem Ergebnis der serologischen Prüfung der einzelnen Tiere, wurde in Hauptversuch I eingehend gewürdigt.

Bemerkenswert sind die Ergebnisse bei Verimpfung von Organmaterial, das vorher einer Vorbehandlung unterzogen wurde. Die verhältnismäßig hohen Verluste an Impftieren durch interkurrente Todesfälle gaben Veranlassung, versuchsweise das zur Verimpfung gelangende Material vorzubehandeln; damit sollte der tödliche Einfluß der Begleitbakterien auf die Impftiere ausgeschaltet werden.

Zur Vorbehandlung wurde in einem Vorversuch 20 prozentiger Alkohol ohne Einwirkungszeit und 0,1 prozentiges Antiformin mit einer Einwirkungszeit von 1¾ Stunden verwendet. Die Prüfung wurde an dem Einzelfall E. 92 vorgenommen. Die primär mit nicht vorbehandeltem Material geimpften 5 Meerschweinchen verendeten sämtlich innerhalb zweimal 24 Stunden. Mit dem mit Alkohol und Antiformin vorbehandelten Material wurden weiterhin je 5 Meerschweinchen geimpft. Das Ergebnis war folgendes: Von den mit Alkohol vorbehandeltem Material geimpften Meerschweinchen verendete nur 1 interkurrent am elften Tage nach der Impfung; die übrigen 4 Impftiere konnten 33 Tage (1 Impftier) bezw. 49 Tage (3 Impftiere) nach der Impfung gesund der serologischen Prüfung zugeführt werden. Von den mit Antiformin vorbehandelten Material geimpften Meerschweinchen verendeten 2 am Tage nach der Impfung; die übrigen 3 Impftiere wurden

am 49. Tage nach der Impfung der serologischen Prüfung unterzogen. Da das Ergebnis bei der Vorbehandlung mit Alkohol ein besseres war als bei der mit Antiformin, wurde bei weiteren Versuchen bei Nachimpfungen von Meerschweinchen das Organmaterial mit Alkohol vorbehandelt.

Die Vorbehandlung mit Alkohol wurde insgesamt bei weiteren 3 Einzelfällen durchgeführt. Die Zahl der Impftiere betrug dabei insgesamt 15; 6 Impftiere wurden mit nicht vorbehandeltem Material geimpft, 9 mit vorbehandeltem Material. Erstere 6 Meerschweinchen verendeten sämtlich 1 bis 2 Tage nach der Impfung interkurrent; von den letzteren 9 Impftieren verendete keines innerhalb 30 bezw. 31 Tagen nach der Impfung, zu welchem Zeitpunkt die Tiere gesund der serologischen Prüfung unterstellt werden konnten.

Ob und inwieweit die Vorbehandlung von Organmaterial mit Alkohol zwecks Verhütung von interkurrenten Todesfällen bei den Impftieren zweckdienlich ist, soll weiteren ausgedehnten Versuchen vorbehalten bleiben. Immerhin erscheint eine Nachprüfung meiner Beobachtung angezeigt.

Am Schlusse meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Direktor Dr. Drescher für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Materials sowie für die gütige Anleitung und Beratung während der Arbeit meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Auch Herrn Veterinärmedizinalrat Dr. Hopfengärtner bin ich für die freundliche Anleitung und Beihilfe bei der Durchführung meiner Versuche zu großem Dank verpflichtet.

Literaturangaben.

1. Ascoli, A.. Sull' isolamento del Bacillo di Bang. Clinic. vet. pag. 339. Ref. Jahresbericht über die Vet. Med., Bd. 33. 1913 S. 95.
2. Ascoli, A., Technische Winke zur Züchtung des Bang'schen Bazillus. B. T. W. 1913 Bd. 29. S. 301.
3. Büchli, K., Das ansteckende Verwerfen beim Rind (Abortus infectiosus bovis). D. T. W. 1919 S. 47.
4. Drescher und Hopfengärtner, Die Haltbarkeit der Bang'schen Abortusbazillen in Milch und Milchprodukten. M. T. W. 1930 Nr. 37 bis 42.
5. Eber, A., Das seuchenhafte Verkalben und seine Bekämpfung. D. T. W. 1923 N. 24. S. 281.
6 Eber, A, Zusammenfassende Bemerkungen über Ätiologie. Diagnose und Epidemiologie des seuchenhaften Abortus der Rinder. Vortrag gehalten auf der Hundertjahrfeier deutscher Naturforscher und Ärzte in Leipzig 1922 Ref. D. T. W. 1922. Bd. 30. S. 520.
7. Ehrlich, Erfahrungen mit verschiedenen diagnostischen Methoden zur Feststellung des seuchenhaften Verkalbens. Aus dem Bericht über die Fachtierärztetagung zur Bekämpfung von Aufzuchtkrankheiten in Jena vom 1. bis 4. Oktober 1927. D. T. W. 1928. S. 56.
8. Evans, A. C., Bacillus abortus in market-milk. I. of the Washington Acad. of Sciences. Vol. 5. 1915, p. 122. Zentrbl. f. Bakt. Ref. Bd. 66. 1918. S. 133.
9. Fitch, C. P., The Cultivation of Bakterium abortus Bang. (I. of inf. Dis. 1922, 31, p. 233) Ref. Zentrbl. f. Bakt. Abtg. I. Ref. Bd. 75. 1923—24 S. 273.
10. Fleischhauer, G., Beitrag zur Züchtung der Abortus Bang Bazillen aus dem Tierkörper mittels verschiedener Methoden. D. T. W 1927, Nr. 42. Ref. T. R. Bd. 33. 1927, S. 921.
11. Frieß, F., Über das Vorkommen des Bazillus abortus Bang im Blute. In.-Diss. München 1929.
12. Frisch, Die Leuchtgasmethode zur Züchtung des Bakt. Abort. infekt. Bang. D. T. W. 1929. S. 309.

13. Goerttler, V., Ein einfaches Verfahren der Züchtung von Abortus Bangbazillen aus dem Tierkörper. B. T. W. 1925. Nr. 25, S. 387.
14. Harms, A., The number of the generations weessarg for the development of the power of aerobic growth by Bakt. abort. (Bang), (I. of Bakt. 1924, 9, p. 273) Zentrbl. f. Bakt. Abtg. I. Ref. Bd. 77. 1924. S. 460.
15. Haupt, H., Kurze Mitteilung über einen zur Züchtung des Bakt. abort. Bang geeigneten Nährboden. Zentrbl. f. Bakt. Orig. Bd. 120. 1931 Heft 1/3. S. 130.
16. Holth, H., Untersuchungen über die Biologie des Abortusbazillus und die Immunitätsverhältnisse des infekt Abortus der Rinder. Zeitschr. f. Infektionskr. d. H. Bd. 10. 1911. S. 207.
17. Hopfengärtner, M., Der kombinierte Tierversuch zum Nachweis des Bazillus abortus Bang in Feten und Eihäuten. In.-Diss. München 1923.
18. Huddleson, I. F., Studies in infektions abortion. Zentrbl. f Bakt. Abtg. I. Ref. Bd. 73. 1922. S. 177.
19. Hutyra-Marek, Spezielle Pathologie und Terapie der Haustiere. 1913. S. 748.
20. Ispolatow, W., Zur Frage nach dem Zusammenhang zwischen dem infektiösen Bang'schen Abortus und dem ansteckenden Scheidenkatarrh der Rinder. Zeitschr. f. Infektkr. d. H. Bd. 37. 1930. S. 44.
21. Kristensen, M., Untersuchungen über die Rolle des Bang'schen Abortusbazillus als menschenpathogenen Mikroben. Zentrbl. f. Bkt. I. Orig. Bd. 108. 1928. S. 89.
22. Kolle, Kraus, Uhlenhuth, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. 1930. S. 364.
23. Lerche. Über die Diagnostik und die Bekämpfung des infekt. Abortus beim Rind. T. R. Bd. 30. 1924. S. 111.
24. Lerche. Abortus Bang-Bazillen in Milch und Milchprodukten. Zeitschr. f. Infektkr. d. H. Bd. 38. 1931. S. 268.
25. Ossberger, J., Das Vorkommen des Bazillus abortus Bang im Blute. In.-Diss. München 1929.
26. Prillwitz, F. A., Über das Vorkommen von Abortus-Bangbakterien in den Geschlechtsorganen und im Euter von Schlachtrindern. In. Diss. Hannover 1926.
27. Roch, W., Das Verhalten des Bazillus abortus Bang in Rinderblut und Rinderserum gegenüber Konservierungsmitteln. In.-Diss. München 1930.
28. Rohonyi, N., Über den infektiösen Abortus. D. T. W. Bd. 37. 1929. S. 249.

29. Rose, W., Beitrag zur Diagnose und Bekämpfung des seuchenhaften Rinderabortus. T. R. Bd. 33. 1927. S. 55.
30. Rudolf, J., Beitrag zur Züchtung des Bazillus abortus Bang mit Hilfe der Leuchtgasmethode. D. T. W. 1928. S 481.
31. Schloßmann, K., Über das Vorkommen der Banginfektion in Estland. Zeitschr f. Hygiene Bd. 111. 1930. S. 554.
32. Stang-Wirth. Tierheilkunde und Tierzucht A. O. Stoß. S. 40. 1926.
33. Sickmüller, E., Zur Kultur des Tuberkelbazillus. D. T. W. 1930. S. 323.
34. Stafseth, H. J., A few notes on the isolation and cultivation of Bact. abortus with special reference to liver and spleen media. (Michig. Agrig. Coll. Exp. Stat. Tech. Bull. Nr. 49 Nov. 1920 p. 7.) Zentrbl. f. Bakt. Abtg. I. Ref. Bd. 72. 1921. S. 366.
35. Stafseth, H. J. and Huddleson J. F., Studies in infect. abort. (Michig. Stat. Techn. Bull. Bd. 49) Ref. Jahresbericht über die Veterinär-Mediz. Bd. 43. 1923. S. 63.
36. Smillie, E. W., An improvement in the method of isolating and recovering the bacillus of cattle abort. through guinea pigs. Ref. Jahresbericht über die Vet.-Med. Bd. 41/42. 1921/22. S. 123.
37. Smith, Th., Some cultural characteristics of Bacillus abortus (Bang) with special reference to Co_2 requirements. Zentrbl. f. Bakt. Bd. 78. Abtg. I. Ref. 1925., S. 136.
38. Smith, Th., Variations in Co_2 requirements among bovine strains of Bacillus abortus (I. of exp. M. 1926, 43, p. 317) Zentrbl. f. Bakt. Bd. 83. 1926. Ref. S. 314.
39. Steck, W., Über das Vorkommen des Bakt. ab. infect. Bang in der Milch gesunder Kühe. Schweiz. Archiv f. Tierheilk. Bd. 60. 1918 S. 547.
40. Stickdorn., Die Alkalität der Nährböden nach der Michaelis'schen Indikatorenmethode, in ihren Beziehungen zum Bakteriumwachstum. Zeitschr. f. Immunitätsforschung Orig. Bd. 33. 1922. S. 576.
41. Weigmann, F., Exper. Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Bakt. ab. und Bakt. melitense Zentrbl. f. Bakt. Abtg. I. Orig. Bd. 121. 1931. S. 318.
42. Wilson, G. S., The gaseous requirements of B. abortus (bovine type). (Brit. I. exp. Pathol. 12, 88–92. 1931) Zentrbl. f. Bakt. Ref. Bd. 103, 1931. Nr. 5/6 S. 106.
43. Winkler. M., Über die Ausscheidung des Bacillus abortus Bang mit der Milch. In.-Diss. 1919. Ref. Jahresber. über d. Vet. Med. Bd. 39-40 1919/20. S. 76.
44. Witte, J., Vergleichende Untersuchungen über die Verwertbarkeit der Komplementbindung mit aktivem und inaktivem Serum sowie mit der Agglutination bei der Diagnose des seuchenhaften Verkalbens. Zeitschr. f. Infektkr. der Haustiere Bd. 27. 1925. S. 207.

45. Zeller, H., Beziehungen zwischen dem Erreger des infekt. Abortus der Rinder und des Maltafiebers. B. T.W. Bd. 30. 1920. S. 345
46. Zeller, H., Weitere Untersuchungen über das seuchenhafte Verwerfen des Rindes. Archiv f. wissensch. und pr. Tierhk. Bd. 49. 1923, S. 65.
47. Zwick, W., Forschungen über das seuchenhafte Verwerfen des Rindes während der letzten zwei Jahrzehnte. Arb. aus dem Reichsgesundheits-Amt Bd. 57. 1926. S. 360
48. Zwick-Krage, Über die Ausscheidung von Abortusbazillen mit der Milch infizierter Tiere. B. T. W. 1913. S. 41.
49. Zwick-Wedemann, Biologische Untersuchungen über den Abortusbazillus. Arb. aus dem Reichsgesundheits-Amt Bd. 43. 1913 S. 130.
50. Zwick-Zeller, Über den infekt. Abortus des Rindes. Arb. a. d. Reichsgesundheits-Amt Bd. 43. 1913. S. 1.

Lebenslauf.

Am 28. Februar 1906 wurde ich, Joseph Ludwig Heinrich Witzigmann, als Sohn des damaligen Distriktstierarztes Heinrich Witzigmann und seiner Ehefrau Elise Witzigmann geb. Steiner, in Haßloch (Bez.-Amt Neustadt a. d. Hdt.) geboren. In Hammelburg (Ufr.) besuchte ich die Volksschule und das Progymnasium, in Rosenheim das humanistische Gymnasium, wo ich im April 1925 das Reifezeugnis erhielt.

Vom Sommersemester 1925 ab widmete ich mich in München und Leipzig dem Studium der Veterinärmedizin und erlangte im Januar 1931 die Approbation als Tierarzt.

Von Anfang März 1931 bis Ende Januar 1932 war ich, abgesehen von einer dreimonatigen Unterbrechung mit der Anfertigung vorliegender Arbeit beschäftigt.